

**IDENTIFICACIÓN DE INTERACCIONES PROTEICAS DE
ADAMTS19 EN UN CONTEXTO OVÁRICO**

MARIA CAMILA FETIVA MORA

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL
ROSARIO**

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C. FEBRERO DE 2017

**IDENTIFICACIÓN DE INTERACCIONES PROTEICAS DE
ADAMTS19 EN UN CONTEXTO OVÁRICO**

MARIA CAMILA FETIVA MORA

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial para optar al título de
MAGISTER EN GENÉTICA HUMANA**

DIRECTOR

PAUL LAISSUE MD, MSc, PhD, HDR

CO-DIRECTOR

DORA FONSECA MSc, PhD (c)

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL
ROSARIO**

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C. FEBRERO DE 2017

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Nota de Aceptación

Director

Co-Director

Jurado

Jurado

Bogotá D. C. Febrero de 2017

A la vida...

A mi papá en el cielo

Agradecimientos

A Dios y al universo por bendecirme en este camino.

A mi mamá por hacer todo cuanto estuvo a su alcance para ayudarme y por ser el mejor ejemplo.

Al grupo CIGGUR y al Dr. Paul Laissue por entregarme su experiencia y conocimiento para crecer intelectualmente durante la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Dora Fonseca por ser inspiración, guía, apoyo y cariño a lo largo de la realización de esta tesis.

A mis grandiosos amigos que me acompañaron y me ayudaron incondicionalmente a construir este camino.

A la universidad del Rosario a Colciencias y al programa de jóvenes investigadores por la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación.

1. Tabla de contenido

2. Resumen.....	1
3. Introducción.....	2
4. Marco Teórico.....	3
4.1 Foliculogénesis.....	3
4.1.1 Formación folicular.....	4
4.1.2 Mantenimiento de los folículos primordiales y reclutamiento inicial.....	6
4.1.3 Formación de la teca	8
4.1.4 Formación del folículo antral, FSH y síntesis de estradiol.....	10
4.1.5 Folículos preovulatorios, expansión del cumulus, ovulación y luteinización.....	13
4.2 Falla ovárica prematura	16
4.2.1 Epidemiología	17
4.2.2 Etiología.....	17
4.2.2.1 Causas iatrogénicas	18
4.2.2.2 Causas autoinmunes.....	19
4.2.2.3 Causas genéticas	20
4.2.2.3.1.1 Síndrome de Turner.....	21
4.2.2.3.1.2 Síndrome de X frágil.....	22
4.2.2.3.1.3 Galactosemia	23
4.2.2.3.1.4 Ataxia telangiectasia	24
4.2.2.3.1.5 Síndrome de Blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPES).....	25
4.2.2.3.2 Causas no sindrómicas de FOP	26
4.2.2.3.2.1 Receptores de gonadotropinas	27
4.2.2.3.2.1.1 <i>FSHR</i>	28
4.2.2.3.2.1.2 <i>LHCGR</i>	30
4.2.2.3.2.2 <i>FOXL2</i>	31
4.2.2.3.2.3 <i>NOBOX</i>	31
4.2.2.3.2.4 <i>NR5A1</i>	33
4.2.2.3.2.5 <i>BMP15</i>	34
4.2.2.3.2.6 <i>FIGLA</i>	35
4.2.2.3.2.7 <i>STAG3</i>	36
4.2.2.3.2.8 <i>NANOS3</i>	37
4.3 Matriz extracelular	38
4.3.1 Funciones generales de la MEC.....	39
4.3.1.1 Soporte estructural.....	40
4.3.1.2 Migración celular	40
4.3.1.3 Señalización celular	41
4.3.1.4 Interacción celular	42
4.3.2 Componentes estructurales de la MEC y su presencia en el ovario.....	42
4.3.2.1 Lamininas.....	43
4.3.2.2 Colágenos	43
4.3.2.3 Fibronectinas.....	44
4.3.2.4 Elastina.....	44
4.3.2.5 Proteasas de la MEC	45
4.3.2.5.1 Metaloproteinasas de la MEC	45
4.3.3 Funciones de la MEC en el desarrollo ovárico de los mamíferos.....	48

4.3.3.1	MEC en el desarrollo folicular.....	49
4.3.3.2	MEC en la ovulación	50
4.3.3.3	Atresia folicular	52
4.3.3.4	Formación y regresión del cuerpo lúteo	52
4.4	Desintegrinas y metaloproteinasas con motivos trombospondina ADAMTS.....	54
4.4.1	Estructura de las proteínas ADAMTS	55
4.4.2	Regulación de las ADAMTS.....	57
4.4.3	Funciones de las proteínas ADAMTS.....	59
4.4.3.1	Funciones de las proteasas ADAMTS en la fertilidad	60
4.4.4	ADAMTS19	63
4.5	COL6A2.....	66
5.	Preguntas de investigación.....	68
6.	Objetivos de la Investigación	69
6.1	Objetivo general	69
6.2	Objetivos específicos.....	69
7.	Materiales y métodos.....	70
7.1	Identificación de las proteínas de interacción (<i>partners</i>) de ADAMTS19 mediante el sistema de doble híbrido en levaduras.....	70
7.2	Sistema de doble híbrido en células eucariotas.....	74
7.2.1	Construcciones plasmídicas de ADAMTS19 y COL6A2	77
7.2.1.1	Extracción de ARN de piel	77
7.2.1.2	PCR para clonaje en pCR4.....	78
7.2.1.3	Sub Clonaje del ADNc de ADAMTS19 y de COL6A2 en pCR4.....	82
7.2.1.3.1	Transformación	84
7.2.1.3.2	PCR de verificación del clonaje en pCR4.....	85
7.2.2	Generación de la mutación c.2828C>T de ADAMTS19 mediante mutagénesis dirigida por PCR	86
7.2.2.1	PCR fusión.....	89
7.2.3	Clonaje del ADNc de ADAMTS19 c.2828C>T en pCR-XL-TOPO.....	91
7.2.4	Generación del amplicón de ADAMTS19 c.2828C>T	93
7.2.5	Clonaje del fragmento de ADAMTS19 WT, ADAMTS19 mut y COL6A2 en los vectores pACT y pBIND mediante el método de digestión/ligación enzimática.....	94
7.2.5.1	Digestión con enzimas de restricción.....	94
7.2.5.2	Ligación de los fragmentos ADAMTS19 WT, y ADAMTS19 mut, en el vector pACT y de COL6A2 en el vector pBIND.....	95
7.2.5.3	Transformación	97
7.2.6	Co-transfección de las construcciones plasmídicas	98
7.2.6.1	Protocolo de transfección	99
7.2.7	Ensayo: Dual-Luciferase Reporter Assay System.....	99
7.3	Co-inmunoprecipitación.....	100
7.3.1	Construcciones plasmídicas.....	101
7.3.1.1	Subclonaje en pCR4-TOPO.....	101
7.3.1.2	Transformación	104
7.3.1.3	Digestión.....	105
7.3.1.4	Ligación.....	107
7.3.1.5	Transformación	108

7.3.2	Co-transfección de las construcciones plasmídicas	110
7.3.3	Extracción de proteínas	111
7.3.3.1	Cuantificación de proteínas	111
7.3.4	Inmunoprecipitación.....	112
7.3.4.1	Western Blot	114
7.3.4.2	Transferencia	115
7.3.4.3	Inmunodetección.....	116
7.4	Inmunofluorescencia indirecta.....	117
7.4.1	DIA 1.....	118
7.4.2	DIA 2.....	118
7.4.3	DIA 4 (48 horas después de la transfección)	118
7.4.3.1	Fijación	118
7.4.3.2	Permeabilización	118
7.4.3.3	Bloqueo	119
7.4.3.4	Incubación con anticuerpos	119
7.4.4	DIA 5.....	120
7.5	Ensayos de expresión y ColP en líquido folicular humano	120
7.5.1	Extracción de ARN de líquido folicular.....	120
7.5.2	PCR para <i>ADAMTS19</i> y <i>COL6A2</i> a partir de ADNc de líquido folicular humano.	121
7.5.3	Extracción de proteínas de líquido folicular	122
7.5.3.1	Cuantificación de proteínas	122
7.5.4	Co-inmunoprecipitación del líquido folicular humano.....	123
7.6	Ensayos de expresión de <i>ADAMTS19</i> y <i>COL6a2</i> en ovario de ratón Balb/c	123
7.6.1	Extracción de RNA de ovario de ratón Balb/c.....	123
7.6.2	PCR de <i>Adamts19</i> y <i>Col6a2</i> a partir de ADNc de ovario de ratones Balb/c (RT-PCR)	123
8.	Resultados	125
8.1	Sistema de doble híbrido en levaduras	125
8.2	Sistema de doble híbrido en células eucariotas - <i>CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System</i> con secuencias humanas.	126
8.2.1	Western blot de co-transfección de los plásmidos codificantes de los fragmentos proteicos de <i>ADAMTS19</i> y <i>COL6A2</i>	127
8.2.2	Resultados de inmunofluorescencia indirecta	129
8.3	Co-inmunoprecipitación post-transfección.....	132
8.3.1	Inmunofluorescencia indirecta de <i>ADAMTS19WT</i> y <i>ADAMTS19Mut</i> con <i>COL6A2</i> en células CHO.....	134
8.4	Ensayos de co-expresión de <i>ADAMTS19</i> y <i>COL6A2</i>	136
8.4.1	Western blot de líquido folicular humano	137
8.5	Co-inmunoprecipitación a partir de líquido folicular humano	138
9.	Discusión y perspectivas	139
10.	ANEXO 1	143
11.	Bibliografía	174

Figuras

Figura 1. Estadio de la foliculogénesis	4
Figura 2. Producción folicular de esteroides.....	10
Figura 3. Fisiología de la dinámica folicular.	18
Figura 4. Conformación estructural de las proteínas ADAM y ADAMTS	47
Figura 5. Estructura de las proteínas ADAMTS	57
Figura 6. Dominios estructurales de ADAMTS19.....	64
Figura 7. Estructura de COL6A2	67
Figura 8. Principio del tamizaje de doble híbrido ULTimate Y2H (Hybrigenics).	71
Figura 9. Alineamientos de secuencias de proteína de humano y de ratón correspondientes a ADAMTS19.....	73
Figura 11. Mapa del vector pACT	76
Figura 12. Mapa del Vector pBIND.....	76
Figura 13. Mapa del vector pG5luc	77

Figura 14. Alineamiento de las secuencias proteicas de humano y de ratón de COL6A2	80
Figura 15. Vector pCR4-TOPO	83
Figura 17. Mapa del vector pcDNA3.....	106
Figura 18. Mapa de siembra WB-co-inmunoprecipitación post-transfección.	115
Figura 19. Resultados expresados en URL (unidades relativas de luciferasa) del ensayo doble híbrido en eucariotas.	127
Figura 20. WB de verificación del CM.....	128
Figura 21. Resultados de la inmunofluorescencia indirecta, post transfección individual de las construcciones del CM en células CHO	130
Figura 22. COL6A2 se colocaliza y forma agregados citoplasmáticos con ADAMTS19 WT y con ADAMTS19 mutante en células CHO co-transfectadas con las construcciones plasmídicas de CM.....	131
Figura 23. COL6A2 interactúa con ADAMTS19 WT (carriles 1) y (mut carriles 2) en células CHO transfectadas.	133
Figura 24. Ilustración esquemática de la interacción entre ADAMTS19 y COL6A2	134
Figura 25. Co-localización de ADAMTS19 y COL6A2 en células CHO transfectadas.. ...	135
Figura 26. Expresión de ADAMTS19 y COL6A2.	136
Figura 27. Western blot. Extracto de proteínas totales de líquido folicular humano.....	137
Figura 28. Co-inmunoprecipitación de ADAMTS19 y COL6A2 en una muestra de líquido folicular humano	138

Tablas

Tabla 1. Modelos murinos con defectos en el desarrollo de los folículos antrales.....	12
Tabla 2. Mutaciones en <i>FSHR</i> causales de FOP no sindrómica	29
Tabla 3. Categorías de la interacción entre proteínas, según el sistema de <i>Hybrigenics</i> , Global PBS.....	74
Tabla 4. Primers de amplificación para <i>ADAMTS19</i> y <i>COL6A2</i>	80
Tabla 5. Condiciones de la PCR para el subclonaje en pCR4.	81
Tabla 6. Condiciones del clonaje en pCR4-TOPO	83
Tabla 7. Condiciones PCR de verificación del clonaje.....	85
Tabla 8. <i>Primers</i> para mutagénesis dirigida de <i>ADAMTS19</i> , en rojo la variante c.2828C>T.	86
Tabla 9. Condiciones de PCR fragmentos A y B.....	87
Tabla 10. Programa del termociclador para la PCR de amplificación de los fragmentos A y B del gen <i>ADAMTS19</i>	88
Tabla 11. Programa del termociclador para la segunda ronda de PCR.....	90
Tabla 12. Reacción de clonaje TOPO® XL PCR.	91
Tabla 13. Condiciones PCR de verificación del clonaje.....	92
Tabla 14. Condiciones de digestión	94
Tabla 15. Cálculos para la ligación de <i>ADAMTS19</i> WT, y <i>ADAMTS19</i> mut, en el vector pACT y de <i>COL6A2</i> en el vector pBIND.	95
Tabla 16. Condiciones de reacción de las ligaciones de pACT y <i>ADAMTS19</i> WT, pACT y <i>ADAMTS19</i> mut y pBIND y <i>COL6A2</i>	96
Tabla 17. Cálculos de la transfección	98
Tabla 18. <i>Primers</i> <i>ADAMTS19</i> y <i>COL6A2</i> para construcciones de co-inmunoprecipitación.	102
Tabla 19. Condiciones PCR para la generación de los amplicones <i>ADAMTS19</i> y <i>COL6A2</i>	102
Tabla 20. Condiciones de clonaje en pCR4-TOPO.	103
Tabla 21. Condiciones PCR de verificación del clonaje.....	104
Tabla 22. Condiciones de la digestión enzimática pCR4-TOPO/ <i>ADAMTS19</i> -WT, pCR4-TOPO/ <i>ADAMTS19</i> mut, y pCR4-TOPO/ <i>COL6A2</i> y el vector pcDNA3	106
Tabla 23. Cálculos para ligación enzimática.....	107
Tabla 24. Condiciones de reacción de ligación enzimática de pcDNA3.	108
Tabla 25. Condiciones de la PCR de verificación.....	109
Tabla 26. Cálculos de la transfección para CoIp.....	110
Tabla 27. Cuantificación de extracción de proteínas en células transfectadas (M1 y M2) y células no transfectadas.....	112
Tabla 28. Mezclas de CoIp. Matrices inmunocruz, anticuerpos de CoIp y anticuerpos primarios usados en WB.	113
Tabla 29. Preparación de geles de WB.	114
Tabla 30. Anticuerpos usados en IFI.....	119

Tabla 31. Condiciones de PCR.	121
Tabla 32. Cuantificación de extracción de proteínas de líquido folicular humano.....	122
Tabla 33. Condiciones de PCR.	124
Tabla 34. Resultados de <i>PBS ULTImate Y2H SCREEN Mus musculus - Adamts19 vs Mouse Ovaries_RP1</i>	125

Anexos

Anexo 1: Artículo sometido. **Reproduction. 2017. Identifying protein interaction partners in the ovary for the orphan ADAMTS19 metalloproteinase.** Fonseca Dora; Fetiva Camila; Pannetier Maelle; André Marjolaine; Bello Sandra; Buitrago July; Esteban-Perez Clara; Moreno-Ortiz Harold; Lucena Elkin; Castro Andrés; Nieto José; Pailhous Eric; Laissue Paul.

2. Resumen

Las proteínas ADAMTS (desintegrinas y metaloproteinasas con motivos trombospondina) han sido asociadas a diversos procesos biológicos entre ellos el desarrollo folicular y la ovulación. Algunos miembros son considerados proteínas huérfanas debido a que no se han descrito sus sustratos específicos (e.g. *ADAMTS19*). Específicamente *ADAMTS19* ha sido sugerido recientemente como un gen candidato de FOP. En el presente trabajo se realizó un tamizaje de las potenciales proteínas de interacción (*partners*) de *ADAMTS19* mediante el sistema de doble híbrido en levaduras. Se realizó coimmunoprecipitación en células transfectadas y en líquido folicular humano para verificar la interacción directa entre *ADAMTS19* y *COL6A2*. Ensayos de RT-PCR efectuados para evaluar la coexpresión de *Adamts19* y *Col6a2* en ovarios de ratón. Adicionalmente, la técnica de inmunofluorescencia indirecta usó para evaluar la colocalización de las proteínas. Se encontró que *ADAMTS19* se une directamente a *COL6A2* en un contexto ovárico lo que se correlaciona con los hallazgos de coexpresión y de colocalización en líquido folicular humano. Proponemos que *ADAMTS19* actúa sobre las microfibras de *COL6A2* durante el crecimiento folicular y la expansión de la lámina basal. Encontramos que la mutación p.Thr943Ile *ADAMTS19* identificada previamente en una paciente con FOP no alteraba la interacción *ADAMTS19*/*COL6A2*. Sin embargo, no descartamos que la mutación contribuya al fenotipo de FOP. Los resultados de este trabajo, que describen la primera proteína de interacción directa de *ADAMTS19*, arrojan nuevos datos sobre la función de las metaloproteinasas en la biología del ovario y la fertilidad.

3. Introducción

La falla ovárica prematura (FOP) es una de las principales causas de infertilidad femenina, ya que afecta del 1% al 2% de las mujeres menores a 40 años. Aproximadamente en el 80% de los casos la etiología de la FOP es idiopática, lo cual sugiere causas genéticas. Algunas proteínas ADAMTS (desintegrinas y metaloproteinasas con motivos trombospondina) han sido relacionadas con fenotipos de infertilidad (entre ellos la FOP) posiblemente debido a que estos factores participan principalmente en la remodelación de la matriz extracelular, y se han encontrado presentes en oocitos durante diferentes etapas del desarrollo folicular y la ovulación. ADAMTS19 ha sido relacionada con la etiología de la FOP principalmente por estudios de asociación. Además, su expresión gonadal en ratones XX ha sido demostrada ha sugerido una función primordial en la fertilidad. Sin embargo, ADAMTS19 pertenece al grupo de proteínas ADAMTS huérfanas debido a que no se conocen sus sustratos ni sus funciones.

El presente trabajo describe el primer de tamizaje de proteínas de interacción de ADAMTS19 en un contexto ovárico, y su rol potencial durante la fertilidad femenina. Adicionalmente, se realizaron ensayos funcionales de la mutación p.Thr943Ile ADAMTS19 identificada previamente en una paciente con FOP.

4. Marco Teórico

4.1 Foliculogénesis

La foliculogénesis implica el crecimiento del folículo y su desarrollo a través de diferentes estadios, desde la formación del *pool* folicular en la ovogénesis, hasta el momento en el cual el oocito es ovulado o inicia una atresia. Al tratarse de un proceso complejo diferentes factores autocrinos, paracrinos y juxtacrinos están involucrados en la foliculogénesis ovárica. El desarrollo, la fisiología y la supervivencia del ovario dependen de varias estructuras y moléculas: el oocito, las células somáticas (células de la teca y de la granulosa), los precursores estrogénicos y la androstenodiona, entre otros. Los pasos esenciales en la foliculogénesis son: la formación de los folículos primordiales, el reclutamiento de folículos para formar folículos primarios, secundarios y terciarios. Posteriormente se produce la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Rajkovic et al., 2006; Edson et al., 2009; David Vantman y Margarita Vega, 2010)(Figura 1).

En este capítulo se detallará sobre la formación folicular y sus diferentes estadios durante el proceso de la foliculogénesis. Además, se resumirá brevemente acerca de los aspectos moleculares más importantes durante este proceso.

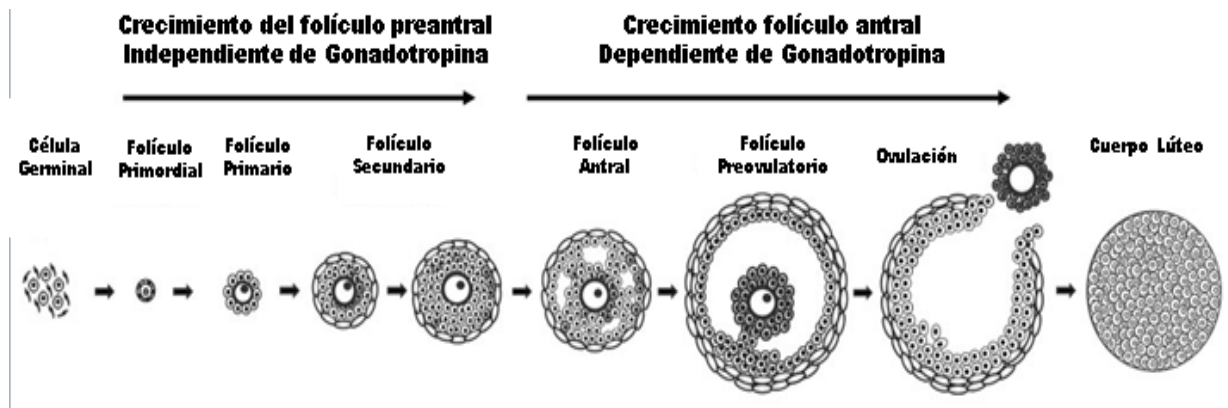


Figura 1. Estadío de la foliculogénesis (Modificado de Edson et al. 2009)

4.1.1 Formación folicular

En los ovarios humanos en desarrollo, las células germinales primordiales producen ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas, hasta cerca de la semana 24 de gestación. En ese momento se encuentran alrededor de 7 millones de ovogonias. Algunas de estas se convierten en oocitos primarios luego del estadio de profase I de la meiosis. La meiosis continúa hasta cerca de los seis meses de vida posnatal momento en que las ovogonias se han convertido en oocitos que permanecen en estadio de latencia en la profase I meiótica. La meiosis termina en el momento de la ovulación. Sin embargo, muchos oocitos sufren atresia fisiológica antes de llegar a la ovulación. Aproximadamente 7 millones de folículos primordiales están presentes en el desarrollo del ovario durante la embriogénesis y de ellos solo 400-500 son ovulados antes de la menopausia fisiológica (Persani et al., 2010)

Durante la foliculogénesis la primera estructura en formarse es el folículo primordial, el cual representa la unidad funcional del ovario de los mamíferos. Previo de la formación de un

folículo ovárico los oocitos se encuentran dentro de clústeres de células germinales. Por lo tanto, la formación del folículo primordial ocurre cuando los oocitos que sobrevivieron al proceso de muerte del clúster de células germinales primordiales son rodeados individualmente por células epiteliales poco diferenciadas, las células de la pregranulosa, que tienen un efecto inhibidor sobre la meiosis y el crecimiento del oocito. Este representa el primer paso de la foliculogénesis y ocurre en la segunda mitad del desarrollo fetal en humano y durante el primer día posnatal en el ratón. En los mamíferos la población de folículos primordiales corresponde al *pool* de oocitos disponibles durante la vida reproductiva femenina (Edson et al., 2009; Kim, 2012).

Desde la óptica molecular es importante señalar que, *FIGLA* (*Factor in the germline α*) es un factor de transcripción específico requerido para la formación inicial de los folículos. Es un gen regulador de los genes de la zona pelúcida *ZP1*, *ZP2* y *ZP3*. Las proteínas de la zona pelúcida forman una matriz rica en glicoproteínas que rodea los oocitos en la etapa del desarrollo que es esencial para la fertilización (Liang et al., 1997). En humanos *FIGLA* es también expresado únicamente en las células germinales femeninas en la semana 14 de gestación. Su expresión disminuye hacia la semana 19, período de tiempo correspondiente al momento de la formación de los folículos primordiales (Edson et al., 2009). Hay mutaciones en *FIGLA* que pueden causar falla ovárica prematura (ver más adelante capítulo 4.2.2.3.2.6).

4.1.2 Mantenimiento de los folículos primordiales y reclutamiento inicial

El reclutamiento folicular se subdivide en dos etapas: la activación inicial de los folículos primordiales, que ocurre durante toda la vida hasta la menopausia, y luego, en la pubertad, el reclutamiento cíclico de un número limitado de pequeños folículos. Un grupo de ellos es seleccionado para la ovulación. Durante la pubertad de 5 a 15 folículos primordiales inician su crecimiento con cada ciclo ovárico. Los folículos primordiales activados se desarrollan en folículos primarios, secundarios y antrales. Solo unos pocos pasan al estado preovulatorio bajo estimulación de la gonadotropina. La transición de un folículo primordial a uno primario se evidencia histológicamente por cambios morfológicos en las células de la granulosa que pasan de escamosas a cuboidales, las cuales formarán posteriormente un epitelio estratificado, luego las células de la granulosa comienzan a expresar marcadores de proliferación. En esta fase se inicia la expresión del gen *FSHR* (receptor de la FSH). La activación de los folículos primordiales depende de la acción de citoquinas exógenas, esteroides, constituyentes de matriz extracelular y factores de crecimiento entre otros (Li et al., 2009).

Durante la maduración del folículo primordial a primario las células de la granulosa segregan mucopolisacáridos entre el oocito y las células de la granulosa circundantes, generando espacios donde se deposita una sustancia que representa el inicio de la zona pelúcida (ZP), la cual es una cubierta extracelular glicoproteíca que rodea a los oocitos. Cuando se alcanza esta etapa de folículo primario, las células de la pregranulosa no ejercen

ningún efecto inhibitor sobre el crecimiento del oocito pero sí sobre la meiosis (Hutt y Albertini, 2007).

Diferentes moléculas activadoras o represoras, y vías de señalización participan en la activación de los folículos primordiales. Neurotrophin, nerve growth factor gene (*NGF*) y su receptor tirosin kinasa NTRK1 intervienen en la activación folicular (Kim, 2012). *NOBOX* (*newborn ovary homeobox gene*), *SOHLH1/SOHLH2* (*spermatogenesis and oogenesis specific basic hélix-loop-helix protein 1 and 2*), son factores de transcripción importantes en la transición del folículo primordial al primario, puesto que son expresados en clústeres de células germinales, en los folículos primordiales y en los folículos primarios. La expresión de *SOHLH1* y *SOHLH2* cesa cuando los oocitos llegan al estado de folículo secundario. *NOBOX* se continúa expresando a lo largo de la foliculogénesis. En modelos murinos se ha evidenciado que la pérdida de cualquiera de estos factores de transcripción puede conducir a fenotipos de esterilidad (Rajkovic et al., 2004).

La ausencia de *Sohlh2* en ratones genera folículos anormales, mientras que los ratones *Nobox*^{-/-} o *Sohlh1*^{-/-} pueden llegar a perder los folículos primarios y han demostrado pérdida de oocitos en la etapa postnatal temprana. Nobox parece regular genes como *Gdf9* y *Pou5f1*. Los efectos fenotípicos en las hembras de ratón *Nobox*^{-/-} han sugerido que este factor de transcripción funciona en etapas de regulación durante la ovogénesis (Joshi et al., 2007).

Los ratones deficientes en cualquiera de los tres factores de transcripción anteriormente mencionados muestran disminución de *Kit* y *Kit ligando*, dos factores importantes de la

foliculogénesis temprana. Durante el desarrollo ovárico postnatal *Kit ligand* es expresado en las células de la granulosa y la pregranulosa y *Kit* en los oocitos. El papel de la señalización de KIT/KIT *ligand* durante la foliculogénesis fue identificada en ratones que de manera natural portaban mutaciones en los genes *Kit* o *Kitl* (Bedell et al., 1995).

4.1.3 Formación de la teca

Posterior al desarrollo del folículo secundario temprano, una segunda capa de células de la granulosa con morfología cúbica aparece en la parte externa del folículo. Estas células conforman la teca. Las primeras células de la teca se empiezan a diferenciar en la teca interna. La teca interna es una capa de células esteroideogénicas, altamente vascularizada, que contiene numerosas mitocondrias, retículo endoplásmico liso y vesículas lipídicas. Estas estructuras son fundamentales para la síntesis de andrógenos, como fuente para la producción de estrógenos por parte de las células de la granulosa. La teca externa está ubicada entre la teca interna y el estroma interfolicular. Está compuesta por fibroblastos y macrófagos, y tiene un papel esencial durante la ovulación. La función principal de la teca durante la foliculogénesis es la producción de esteroides (Hirshfield, 1991; Magoffin, 2005; Edson et al., 2009).

La formación de la teca es independiente de gonadotropinas, debido a la carencia de receptores LH (Hormona Luteinizante) de las células precursoras. La LH controla principalmente la producción de andrógenos de las células tecales. Varios de los factores que regulan la diferenciación de las células tecales siguen sin conocerse (Edson et al., 2009).

Según modelos murinos la diferenciación celular de la teca está influenciada por moléculas como IGF, Kit ligando y GDF9. En los ovarios de ratones *Gdf9*^{-/-} no se observan marcadores de células tecaes como *Cyp17a1*, *Lhcgr* y *Kit*, y se han encontrado gran cantidad de precursores de células tecaes en el intersticio e incremento de la FSH y la LH circulantes (Elvin et al., 1999).

Las células de la teca interna expresan CYP17A1, pero son deficientes en CYP19A1, enzima clave en la conversión de androstenediona en estradiol. CYP19A1 es expresada por células de la granulosa de los folículos en estadios de desarrollo tardío. La expresión de estas enzimas es controlada por gonadotropinas de la hipófisis. En respuesta a la LH, las células tecaes expresan enzimas esteroidogénicas claves como *CYP11A1*, *CYP17A1* y *HSD3B1*. La LH también regula la sobreexpresión de *STAR* quien a su vez facilita la liberación de colesterol hacia la membrana interna mitocondrial, sitio en el que es convertido a pregnolona por acción de CYP11A1. Seguido de la conversión de pregnolona a *dehidroepiandrosterona* (DHEA) por CYP17A1. Posteriormente, *3β-HSD* actúa sobre DHEA convirtiéndola en androstenediona, la cual se difunde a través de la membrana basal de las células de la granulosa que responden a la FSH por la sobreexpresión de *CYP19A1* y de *17βhidroxiesteroide* deshidrogenasa (*HSD17B1*) para finalmente realizar la conversión de la androstenediona en estradiol (Figura 2). El estradiol es esencial en los estadios finales de la foliculogénesis y en la ovulación por su acción moduladora de la producción de andrógenos (Edson et al., 2009).

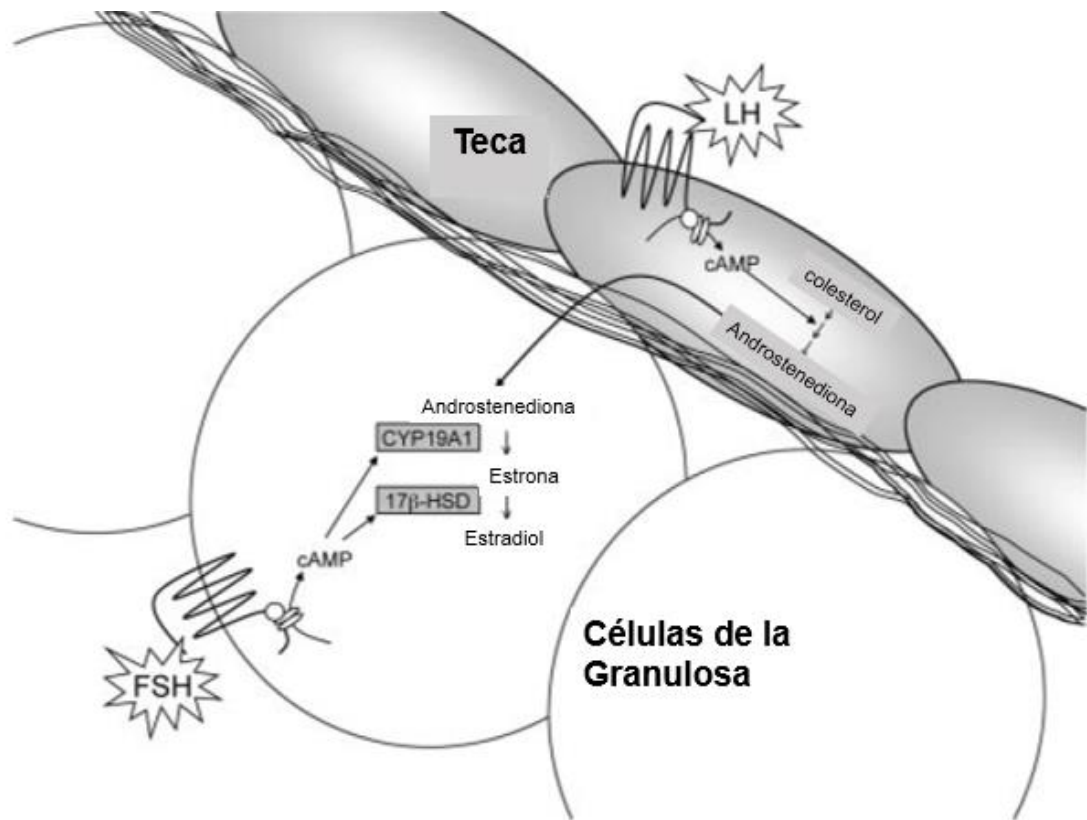


Figura 2. Producción folicular de esteroides (modificado de Edson et al., 2009)

4.1.4 Formación del folículo antral, FSH y síntesis de estradiol

Un número importante de cambios ocurren en el folículo durante la formación del antro, una cavidad que contiene líquido folicular y que separa dos poblaciones de células de la granulosa funcionalmente distintas. Un grupo de estas células forma la pared del folículo y es fundamental para la estereoidogénesis y la ovulación. El segundo grupo de células de la granulosa (del cumulus) rodea el oocito, promoviendo su desarrollo y crecimiento. En la foliculogénesis antral la FSH es esencial para la proliferación de las células de la granulosa, la producción de estradiol, la expresión del receptor de LH y para prevenir la apoptosis de la

granulosa celular durante la atresia folicular (Richards, 1994; Wassarman et al., 2004; Diaz et al., 2007; Edson et al., 2009).

La FSH y la LH son gonadotrofinas hipofisarias que coordinan el desarrollo de los folículos antrales y la ovulación. Regulaciones positivas y negativas en el eje HPG (hipotálamo-hipófisis-gónada) coordinan la maduración folicular, la selección del folículo dominante y la preparación para la gestación. Además de la retroalimentación negativa de estradiol sobre el eje HPG, el ovario produce factores de crecimiento, como activinas, inhibinas y FSTs (Folistatinas), que modulan la secreción de FSH hipofisaria además de actuar localmente sobre la regulación del desarrollo folicular (Chun et al., 1996; Edson et al., 2009).

Los modelos murinos $KO^{-/-}$ de FSH presentaban infertilidad debido a un bloqueo en la foliculogénesis antes de la formación del folículo antral. Los ovarios de estos ratones en la semana 6 postnatal contenían todos los estadios de los folículos tempranos, incluyendo folículos primordiales, primarios y preantrales, lo que comprueba que las fases iniciales de la foliculogénesis son independientes de gonadotrofinas. La regulación y las funciones de la FSH en mamíferos parecen estar evolutivamente conservadas (Edson et al., 2009).

El estradiol no es esencial para la formación del folículo antral, pero es crítico durante el crecimiento y la diferenciación de las células de la granulosa, para el mantenimiento de los folículos antrales y para promover la ovulación. Gran número de factores han sido identificados por su importancia durante la Foliculogénesis (Edson et al., 2009). A través de

modelos murinos KO se han identificado genes críticos en el desarrollo del folículo antral (Tabla 1).

Tabla 1. Modelos murinos con defectos en el desarrollo de los folículos antrales (modificado de Edson et al., 2009).

Gen	Características genéticas	Fenotipo Reproductivo	Estado de fertilidad	Referencia
Desintegrina y metaloproteinasa con motivo trombospondina I (<i>Adams1</i>)	<i>Adams1</i> ^{-/-}	Defectos en el desarrollo de folículos preovulatorios	Subfétil	(Shindo et al., 2000a)
Peptidasa de membrana mitocondrial interna (<i>lmmmp2l</i>) (inserción transgénica)	<i>Lmmp2l</i> ^{Tg(Tyr)979Ove}	Defectos en la foliculogénesis y la ovulación	Infértil	(Lu et al., 2008)
Receptor de insulina substrato 2 (<i>Irs2</i>)	<i>Irs2</i> ^{-/-}	Ovarios anovulatorios pequeños, con número reducido de folículos	Infértil	(Burks et al., 2000)
Receptor de estrógeno α (ER α)	Ratones homocigotos para disrupción del marco abierto de lectura del gen <i>ERα</i>	Folículos hemorrágicos y con quistes, sin CLs o evidencias de ovulación.	Infértil	(Lubahn et al., 1993)

Receptor de estrógeno β (ER β)	<i>ERβ^{-/-}</i>	Bloqueo al final de la foliculogénesis antral y disminución de la ovulación.	Subfétil	(Krege et al., 1998)
Superoxido dismutasa 1 (<i>Sod1</i>)	<i>Sod1^{-/-}</i>	Defecto en foliculogénesis, incapacidad de mantener el embarazo	Subfétil	(Ho et al., 1998; Matzuk et al., 1998)
Caja SRY gen 3 (<i>Sox3</i>)	<i>Sox3^{-/-}</i>	Atresia Folicular y defectos en la oogénesis	Subfétil	(Weiss et al., 2003)
Superfamilia TNF receptor tipo I, miembro 1a (<i>Tnfr1</i>)	<i>Tnfr1^{-/-}</i>	Mejor respuesta a las gonadotrofinas prepuberales; Senescencia ovárica temprana	Subfétil	(Roby et al., 1999)

4.1.5 Folículos preovulatorios, expansión del cumulus, ovulación y luteinización

Cuando el folículo alcanza su mayor crecimiento y madurez por la influencia de la FSH y de la LH, se denomina folículo de Graaf o folículo preovulatorio (Hutt y Albertini, 2007; Baerwald et al., 2012) .

Aunque la mayoría de los folículos del *pool* en crecimiento terminan en atresia, un grupo de folículos antrales alcanzan el estado preovulatorio. Los folículos que sobreviven a esta etapa

son probablemente los más sensibles a la disminución de la FSH en suero, la cual es debida al *feedback* negativo de estradiol e inhibina sobre la hipófisis. El aumento de estradiol sérico inhibe la producción de FSH hipofisaria mientras el incremento de estradiol folicular aumenta la producción de LH. Los folículos preovulatorios expresan el receptor de la hormona luteinizante coriogonadotropina (LHCGR) en altas concentraciones en las células de la granulosa, lo cual les permite responder a la expresión de la LH. Esta regulación inicia una cascada de eventos que conllevan a la reanudación de la meiosis del oocito, la expansión del cumulus, la ruptura del folículo y finalmente a la diferenciación terminal de las células de la granulosa para dar origen al cuerpo lúteo. Los ratones deficientes en LH o en LHCGR son infértiles con defectos en la esteroidogénesis. La foliculogénesis en estos animales se bloquea en el estadio del folículo antral temprano y los folículos preovulatorios y el cuerpo lúteo están ausentes (Edson et al., 2009).

La expansión de las células del cumulus sobre la matriz extracelular que rodea el oocito se inicia por el incremento de la LH para la ovulación normal y la fertilización. La regulación de este proceso es multifactorial y depende de la activación de la señalización de MAPK, así como de factores paracrinos secretados por el oocito (Su et al., 2002).

Durante el periodo preovulatorio tras al incremento de la LH (pico de LH), un gran número de genes son esenciales en la formación y la estabilización de la matriz extracelular del cumulo ooforo. Estos genes incluyen en el ratón: *Has2*, *Ptgs2*, *Tnfaip6* y *Ptx3*. *Has2* (hyaluronan sintasa 2) es requerido para la producción del ácido hialurónico que forma el esqueleto estructural del cumulo de la matriz. *Tnfaip6* (*TNF α induced protein 6*) cataliza la

formación de *crosslinks* entre ácido hialurónico y la cadena pesada de *IaI* (*serum-derived-intra α trypsin inhibitor*). La pentraxina 3 (Ptx3) estabiliza la matriz a través de interacciones con *IaI*. *Ptgs2* (*prostaglandin synthase 2*) es una enzima limitante en la síntesis de prostaglandinas (Edson et al., 2009).

La ovulación ha sido comparada en algunos aspectos con un proceso inflamatorio puesto que es caracterizado por hiperemia folicular, aumento de la producción de prostaglandinas y síntesis de ácido hialurónico. Para la ovulación son requeridos gran variedad de reguladores de la transcripción que son inducidos por la activación del LHCGR. El receptor de progesterona (PR) es rápidamente inducido en las células de la granulosa murales del folículo preovulatorio y su deficiencia causa infertilidad secundaria y anovulación (Richards et al., 2008; Edson et al., 2009)

Luego de la ruptura del folículo y de la liberación del complejo oocito-cumulus el remanente de granulosa y de células teca logran la diferenciación terminal para formar el cuerpo lúteo. Este es responsable de la secreción de progesterona para estimular el útero y mantener el embarazo. En caso de fecundación e implantación el proceso de formación del cuerpo lúteo requiere que las células de la granulosa no estén en fase del ciclo celular. Este proceso es regulado por inhibidores de la progresión del ciclo celular tales como los inhibidores CDK p27 (*Cdkn1b* y *Cdkn1a*). Modelos murinos deficientes en estos genes han demostrado fenotipos de hiperproliferación de las células de la granulosa lo que ha sugerido una acción sinérgica que promueva la salida del ciclo celular de las células de la granulosa en diferenciación (Jirawatnotai et al., 2003). Adicionalmente, se ha encontrado que mutaciones en *CDKN1B* son causales del fenotipo de falla ovárica prematura (Ojeda et al., 2011).

El momento en el que se produce la luteinización es importante para la función reproductiva normal y el hecho de que se produzca luego de la ovulación reitera el rol importante de los inhibidores derivados del oocito en la prevención de la luteinización prematura (Edson et al., 2009).

4.2 Falla ovárica prematura

La falla ovárica prematura (FOP) es una patología frecuente asociada a infertilidad y corresponde a una disfunción ovárica prematura. Se ha definido clínicamente como la detención de la función ovárica, con altos niveles de gonadotrofinas y estrógenos disminuidos que se presenta antes de los 40 años (Cordts et al., 2011). Dependiendo de la edad de inicio la FOP se presenta como amenorrea primaria (sin menarquía) o como amenorrea secundaria (de 4 a 6 meses de evolución) posterior al desarrollo puberal. La FOP se asocia a hipoestrogenismo y niveles séricos de FSH superiores a 40 UI/l. El aumento de la FSH y de LH circulantes son el resultado de la incapacidad del ovario para cerrar un circuito de retroalimentación negativa sobre la hipófisis (Laissue et al., 2008).

Los principales mecanismos que originan la FOP son la disminución en el *pool* de folículos primordiales iniciales, el incremento de la atresia folicular o las alteraciones en el reclutamiento y la maduración de los folículos primordiales (Christin-Maitre et al., 1998; Persani et al., 2010).

4.2.1 Epidemiología

La FOP es una patología frecuente que afecta entre el 1 % y el 1.5 % de las mujeres menores de 40 años y al 0.1 % de la mujeres menores de 30 años (Coulam et al., 1986; Conway, 2000).

La función ovárica intermitente ha sido reportada y el embarazo puede ocurrir en aproximadamente en 5 % al 10 % de las pacientes diagnosticadas con FOP (Droesch et al., 1988).

4.2.2 Etiología

Se sabe que alrededor de 7 millones de folículos primordiales están presentes en el desarrollo ovárico durante la embriogénesis (Figura 3). La mayoría se pierden durante la vida fetal y la posnatal por atresia, y únicamente de 400 a 500 folículos son ovulados antes de la menopausia fisiológica. Los mecanismos que posiblemente dan origen a la FOP son: 1) la disminución inicial en el pool de los folículos primordiales; 2) la atresia folicular acelerada; 3) anormalidades en el reclutamiento y en la maduración de los folículos primordiales. En algunos casos la insuficiencia ovárica ocurre por una depleción anticipada del *pool* de los folículos primordiales. La FOP es entonces considerada como el estado final de dicha insuficiencia. Se ha asociado a la FOP con diversas causas: genéticas, metabólicas, infecciones, enfermedades autoinmunes y factores iatrogénicos. La causa de la FOP es

desconocida en la mayoría de los casos (entre el 50 % al 80 %) (Conway, 2000; Persani et al., 2010).

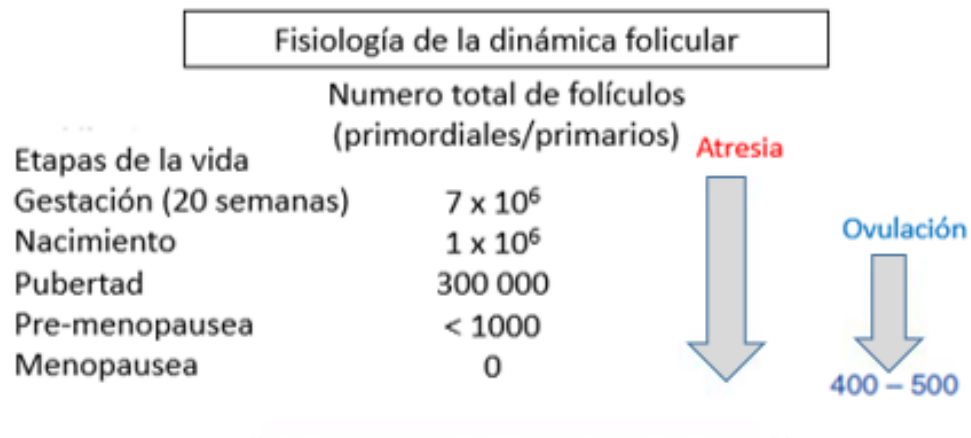


Figura 3. Fisiología de la dinámica folicular (modificado de Persani et al.2010).

4.2.2.1 Causas iatrogénicas

Diferentes tratamientos médicos pueden dar origen a la FOP. Aproximadamente el 25 % de todas las formas de FOP puede ser clasificada como iatrogénicas. Pacientes con enfermedades malignas que han sido tratadas con quimioterapia y radioterapia tienen altas probabilidades de desencadenar FOP. La quimioterapia tiene un efecto citotóxico sobre los ovarios debido a que puede afectar la estructura y la función de las células de la granulosa. La severidad del daño dependerá del tipo de droga, de la dosis administrada, de la edad y de la reserva ovárica de la paciente. Otras causas iatrogénicas son las intervenciones quirúrgicas abdominales y pélvicas. Una pequeña proporción de los casos de FOP se puede

atribuir a tratamientos quirúrgicos por enfermedades ginecológicas benignas como la endometriosis o el síndrome premenstrual. Las cirugías pélvicas tienen potencial de daño ovárico tras el compromiso del flujo sanguíneo (Howell y Shalet, 1998; Amato et al., 2001; Goswami y Conway, 2005; Maclaran et al., 2010).

4.2.2.2 Causas autoinmunes

Las enfermedades autoinmunes son la causa de aproximadamente el 10 % al 20 % de los casos de FOP (Shelling, 2010). Se ha relacionado esta enfermedad con trastornos endocrinos como el hipotiroidismo (25 %), la enfermedad de Addison (3 %) y la diabetes mellitus (2.5 %). Además, se ha descrito en trastornos autoinmunes no endocrinos como la miastenia gravis, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, el síndrome de Sjögren y la enfermedad de Crohn (Conway, 2000; Bakalov et al., 2005; Goswami y Conway, 2005; Maclaran y Panay, 2011).

Un factor importante en la FOP autoinmune es la presencia de autoanticuerpos anti-ovario, los cuales pueden estar presentes en la fase inicial de la destrucción folicular, y son detectados en cerca del 50 % de pacientes. Otros anticuerpos detectados tienen como diana los receptores de gonadotropinas y las células productoras de esteroides, entre otros. La zona pelúcida (ZP) es un importante determinante antigénico de la FOP autoinmune. En pacientes con FOP se han encontrado autoanticuerpos circulantes específicos contra la ZP que pueden afectar la función de las proteínas de la ZP lo que produce una alteración en el desarrollo folicular y conduce a infertilidad (Khole, 2010; Kokcu et al., 2012).

4.2.2.3 Causas genéticas

En el 50 al 80 % de los casos la FOP se clasifica como idiopática, lo cual sugiere la participación de mecanismos genéticos en la patogénesis. Diferentes tipos de anormalidades genéticas autosómicas y ligadas al cromosoma X, tales como rearrreglos cromosómicos y mutaciones puntuales pueden desencadenar casos de FOP sindrómica y no sindrómica. Por ejemplo, se destacan defectos ováricos en pacientes con Síndrome Turner (ST) y otras anormalidades relacionadas con el cromosoma X, lo que sugiere un rol esencial de los genes localizados en estas regiones en funciones ováricas. Deleciones y translocaciones en el cromosoma X han permitido asociar la FOP con tres regiones cromosómicas: *FOP-1* (Xq26-qter), *FOP-2* (Xq13.3-q21.1) y *FOP-3* (Xp11.1-p22.1). Los genes situados en estas regiones son genes candidatos de FOP (Laissue et al., 2006; Woad et al., 2006; Persani et al., 2010).

Además, mutaciones naturales en genes localizados en los autosomas han sido asociadas a la FOP sindrómica y no sindrómica. Las mutaciones en *FSHR*, *LHCGR*, *NR5A1*, *FOXL2*, *NOBOX*, *NANOS3*, *FIGLA*, *BMP15* y *STAG3* han sido formalmente demostradas como causales de la FOP no sindrómica (Laissue, 2015). Sin embargo, como en otras patologías complejas, la FOP puede ser el resultado de efectos sinérgicos y compensatorios resultantes del efecto de distintos tipos de mutaciones. Los fenotipos reproductivos son considerados rasgos cuantitativos secundarios a la interacción sutil de múltiples genes. Desde esta óptica, una cantidad significativa de genes pertenecientes a las diferentes cascadas de regulación de la determinación sexual, la foliculogénesis y la ovulación son candidatos coherentes en la

exploración de factores genéticos etiológicos de la FOP. Estas características sugieren que la FOP es una patología compleja y de origen multifactorial (Conway, 2000; Toniolo, 2006; Laissue et al., 2008; Persani et al., 2010; Laissue, 2015).

4.2.2.3.1 Causas sindrómicas de la FOP

4.2.2.3.1.1 Síndrome de Turner

El síndrome de Turner (ST) es la consecuencia de la ausencia total o parcial de un cromosoma X en la mujer (Sybert y Mccauley, 2004). Aproximadamente en la mitad de los casos hay pérdida del cromosoma X completo, mientras la otra mitad de los casos son debidos a mosaicismos o anormalidades estructurales que conducen a un fenotipo más leve (Bharath et al., 2010). Las mujeres con ST clásicamente presentan baja talla, linfedema congénito, cuello alado, disgenesia gonadal y/o falla ovárica, entre otros. La prevalencia de la enfermedad es de aproximadamente 1:2500 mujeres nacidas vivas (Sybert y Mccauley, 2004). En las mujeres con cariotipo 45,X la pérdida de oocitos aparece en los primeros estadios de la profase meiótica, generando disgenesia gonadal y amenorrea primaria, acompañado de niveles elevados de FSH desde la primera infancia (Reynaud et al., 2004; Fechner et al., 2006).

La disfunción ovárica probablemente surge como consecuencia de la haploinsuficiencia de los genes situados en las regiones *pseudoautosómicas* críticas del cromosoma X que escapan a la inactivación, los cuales requieren una dosis diploide para cumplir una función ovárica adecuada (Zinn et al., 1998; Sybert y Mccauley, 2004; Elsheikh et al., 2015). Un

ejemplo de este mecanismo es el gen *SHOX*, que codifica para una proteína que tiene una función primordial en el crecimiento óseo y participa en el fenotipo de la talla baja en las pacientes con ST (Zinn et al., 1998).

Mujeres con cariotipo 45,X presentan disgenesia gonadal progresiva, a pesar de que el ovario fetal inicia su desarrollo normalmente. Posteriormente, ocurre una apoptosis acelerada y prematura de las células germinales lo que conlleva a la degeneración gonadal. Se ha encontrado que los niveles de FSH en las pacientes con ST se encuentran característicamente en el rango postmenopáusico desde la infancia (Fechner et al., 2006).

4.2.2.3.1.2 Síndrome de X frágil

El síndrome de X Frágil es una enfermedad de herencia dominante ligada al cromosoma X, que se debe a disfunciones del gen del retardo mental del X frágil 1 (*FMRI*) y es caracterizado por déficit cognitivo moderado a severo. En esta enfermedad se produce una expansión mayor a 200 repeticiones de los trinucleótidos CGG localizado en la región 5'UTR del gen. Esto conduce al silenciamiento transcripcional del gen por medio de un proceso de hipermetilación (Bell et al., 1991; Pieretti et al., 1991; Allen et al., 2007).

Los casos de mujeres portadoras de la premutación se definen por la presencia de 55 a 199 repeticiones del trinucleótido (Jr et al., 1993). Aproximadamente 1/250 mujeres son

portadoras de una premutación en *FMRI* y tienen un riesgo incrementado de desarrollar FOP, al igual que las mujeres con microdeleciones en el gen *FMR2* (Allen et al., 2007).

La expansión de tripletes se encuentra en el 13 % de las mujeres con formas familiares de FOP. Una posible explicación de la asociación entre insuficiencia ovárica y el estado de premutación del gen *FMRI* es que la transcripción de los alelos premutados es significativamente alta (Jin y Warren, 2000; Loesch et al., 2007). La proteína FMR1 es altamente expresada en las células germinales del ovario fetal y su desregulación puede afectar la expresión de genes esenciales en el desarrollo del oocito. También se ha encontrado expresión en las células de la granulosa de los folículos en maduración de manera que la acumulación de esta proteína puede favorecer la atresia folicular (Tassone et al., 2000; Badenas et al., 2004).

4.2.2.3.1.3 Galactosemia

La galactosemia es una enfermedad autosómica recesiva causada por la deficiencia de la enzima GALT (galactosa 1-fosfato uridil transferasa). Su incidencia es de 1:50.000 recién nacidos vivos. Se caracteriza clínicamente por la afección de órganos como el hígado, el riñón, el ovario y el corazón. Más de 200 mutaciones en el gen *GALT* han sido descritas. Sin embargo, las mutaciones más comunes son p.Gln188Arg y p.Lys285Asn y causan el 70 % de los casos de galactosemia (Tyfield et al., 1999).

La FOP afecta entre 75 % y 96 % de las mujeres con mutaciones homocigotas del gen *GALT*. En estas pacientes la actividad enzimática se encuentra suprimida casi por completo. La relación entre galactosemia y la FOP se ha evidenciado por un daño en el ovario tras la acumulación tóxica de metabolitos de galactosa que generan la apoptosis de los oocitos, o por la deficiencia de las glicoproteínas y de los galactolípidos involucrados con la FSH y su receptor. Esto disminuye la estimulación ovárica e incrementa la atresia folicular. Las pacientes con galactosemia presentan un número bajo de folículos primordiales, un aumento del número de los folículos atrésicos, y la ausencia completa de los folículos pre-antrales y los pre-ovulatorios (Tedesco y Miller, 1979; Tortorella et al., 2000; Rubio-Gozalbo et al., 2010).

4.2.2.3.1.4 Ataxia telangiectasia

La ataxia telangiectasia (AT) es una patología de herencia autosómica recesiva de tipo neurodegenerativo caracterizada por movimientos descoordinados, telangiectasias oculares, inestabilidad cromosómica, inmunodeficiencia y predisposición al cáncer. Mutaciones en el gen *ATM* que codifica para una proteína quinasa (la cual participa en la regulación del ciclo celular) son causantes de AT. La proteína ATM está involucrada en la maduración del sistema inmunológico y en el mantenimiento de los telómeros. Algunas de las pacientes con AT presentan insuficiencia ovárica debido a la hipoplasia gonadal con ausencia de los gametos maduros. En modelos murinos *Atm*^{-/-} se ha observado pérdida de los folículos primordiales asociado a ovarios extremadamente pequeños. Los folículos primordiales

degeneran durante la profase de la meiosis I de la gametogénesis (Barlow et al., 1996; Shiloh, 2003).

4.2.2.3.1.5 Síndrome de Blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPES)

El BPES es un desorden genético de herencia autosómica dominante poco frecuente (De Baere et al., 2003). Se caracteriza clínicamente por blefarofimosis, ptosis, telecanto y epicanto inverso. Existen dos presentaciones clínicas del BPES. En el tipo I se evidencian malformaciones en los párpados y FOP, mientras que en el tipo II el defecto de los párpados ocurre como un signo clínico aislado (Zlotogora et al., 1983).

Se ha demostrado que mutaciones en *FOXL2* son responsables del síndrome BPES. El gen *FOXL2* (3q23) codifica la proteína *forkhead box L2*, un miembro de la familia de factores de transcripción *forkhead*. Estas proteínas contienen un dominio de unión al ADN de 110 aminoácidos altamente conservado y un tracto de 14 residuos de polialanina. Las mutaciones en *FOXL2* son responsables de los dos tipos de BPES (Crisponi et al., 2001; Lehmann et al., 2003; Hannenhalli y Kaestner, 2009; Benayoun et al., 2011).

Se ha propuesto una correlación genotipo-fenotipo en la cual las proteínas truncadas antes del tracto polialanina están asociadas a BPES tipo I, mientras que las alteraciones en la longitud del tracto conducen a BPES tipo II. Las duplicaciones que generan una extensión del tracto de poli-alaninas actúan como alelos hipomórficos que generan la reducción en la transactivación del dominio *forkhead* (Crisponi et al., 2001; De Baere et al., 2003).

Las mutaciones en *FOXL2* afectan el mantenimiento y la diferenciación del ovario. *FOXL2* está implicado en la transformación de células de la granulosa de epitelio escamoso a cuboidal y en procesos de activación de los oocitos. El modelo murino *Foxl2*^{-/-} presenta alteraciones cráneo-faciales típicas de BPES, ausencia de párpado superior y defectos en el desarrollo folicular temprano. (Crisponi et al., 2001; Uda et al., 2004).

En humanos se han descrito cerca de 125 mutaciones causantes de BPES tipo I y II. Se ha reportado que mutaciones puntuales de *FOXL2* son además responsables de FOP no sindrómica, lo cual fue probado por medio de un estudio funcional de la mutación p.Gly187Asp. La localización subcelular de *FOXL2*-p.G187D en este estudio fue normal pero su capacidad de transactivación fue significativamente menor con respecto a la de *FOXL2* WT (Laissue et al., 2009).

Por otro lado, los estudios que han demostrado la importancia biológica de *FOXL2* en la función ovárica sustentan también su rol potencial en la patogénesis de la FOP no-sindrómica. Sin embargo, de manera inesperada el análisis molecular de la región codificante del gen en cerca de 290 pacientes FOP reveló solo una mutación potencialmente deletérea (c.898-927del) que produce una delección de 10 alaninas en el tracto poli-Ala. Esta mutación heterocigota fue encontrada en una paciente FOP con amenorrea primaria (Harris et al., 2002).

4.2.2.3.2 Causas no sindrómicas de FOP

Además de las formas sindrómicas de FOP que se describieron anteriormente, se han documentado casos no sindrómicos de la enfermedad. Al igual que en las formas sindrómicas la FOP no sindrómica puede ser el resultado de alteraciones en los genes que están localizados sobre los autosomas o sobre los cromosomas sexuales. Pueden distinguirse varios modos de herencia: en primer lugar, autosómicos dominantes o recesivos, y en segundo lugar ligados al cromosoma X. Las causas genéticas de la FOP no-sindrómica se han establecido principalmente mediante análisis de ligamiento de casos familiares y por el tamizaje de genes candidatos propuestos a partir de fenotipos de modelos animales (Laissue et al., 2008).

Además, se han desarrollado modelos murinos con alteración en la reproducción. Estos estudios han permitido proponer varios genes relacionados con la FOP no sindrómica en humanos (Barnett, Schilling, Greenfeld, Tomic, & Flaws, 2006).

A continuación, se presentarán brevemente los principales genes cuyas mutaciones han sido descritas como causales de la FOP no sindrómica.

4.2.2.3.2.1 Receptores de gonadotropinas

Las hormonas FSH y LH se unen a sus receptores transmembrana específicos FSHR y LHCGR respectivamente para regular distintas funciones reproductivas. Estos receptores de hormonas glicoprotéicas pertenecen a la familia de los receptores acoplados a las proteínas G (GPCRs) (Themmen y Huhtaniemi, 2000).

Estructuralmente, los receptores de gonadotropinas tienen un dominio extracelular, uno intracelular y siete α -hélices transmembrana de transducción de señales (Ascoli et al., 2002; Choi y Smitz, 2014).

4.2.2.3.2.1.1 *FSHR*

En 1995 Aittomäki y colaboradores realizaron un análisis de ligamiento en familias finlandesas. Se identificó una asociación entre el locus 2p21 y la disgenesia ovárica hipergonadotrópica (ODG). El locus denominado ODG1 contiene los genes que codifican para el FSHR y para el LHCGR. Por medio de la secuenciación de la región codificante del gen *FSHR* se identificó una mutación de tipo *missense* en estado homocigoto c.C566>T), (p.Ala189Val) localizada en el dominio extracelular de unión a ligando del FSHR. El aminoácido Ala189 se encuentra altamente conservado entre diferentes especies de mamíferos, lo cual sugirió que la mutación era relevante a nivel funcional. Coherentemente, los ensayos funcionales demostraron que esta mutación interfería con la capacidad de unión y con la señal de transducción del receptor (Aittomäki et al., 1995).

Posteriormente, Rannikko y colaboradores en el 2002 caracterizaron los mecanismos moleculares de la mutación p.Ala189Val. El efecto funcional sobre la proteína se asoció a la inactivación del receptor y a la alteración en su plegamiento. Se evidenció una retención citoplasmática del FSHR que condujo a la disminución de su expresión en la superficie celular y a la resistencia completa a la FSH (Rannikko et al., 2002).

Otras mutaciones en el gen *FSHR* han sido validadas funcionalmente (Tabla 2). Los hallazgos han demostrado que las mutaciones que afectan el dominio extracelular, determinan una inadecuada localización del receptor en la membrana plasmática. Por otro lado, las mutaciones que afectan el dominio transmembrana están relacionadas con la alteración de la transducción de señales tras la estimulación hormonal (Beau et al., 1998; Touraine et al., 1999; Doherty et al., 2002; Allen et al., 2003; G. Meduri et al., 2003; Kuechler et al., 2010; Persani et al., 2010).

Tabla 2. Mutaciones en *FSHR* causales de FOP no sindrómica (modificado de Laissue 2015).

DNA	Proteína	Dominio proteico	Referencia
c.479C>T	p.Ile160Thr	Extracelular	(Beau et al., 1998)
c.566C>T	p.Ala189Val	Extracelular	(Aittomäki et al., 1995)
c.671A>T	p.Asp224Val	Extracelular	(Touraine et al., 1999)
c.1043C>G	p.Pro348Arg	Extracelular	(Allen et al., 2003)
c.1255G>A	p.Ala419Thr	Hélice transmembrana 2	(Doherty et al., 2002)
c.1555C>A	p.Pro519Thr	Loop extracelular 2	(G. Meduri et al., 2003)
c.1717C>T	p.Arg573Cys	Loop intracelular 3	(Beau et al., 1998)
c.1760C>A	p.Pro587His	Hélice transmembrana 6	(Kuechler et al., 2010)

c.1801C>G	p.Leu601Val	<i>Loop</i> extracelular 3	(Touraine et al., 1999)
-----------	-------------	----------------------------	-------------------------

4.2.2.3.2.1.2 *LHCGR*

Latronico y colaboradores en 1996 estudiaron una familia compuesta por tres hermanos pseudohermafroditas 46,XY con hipoplasia de células de Leydig y una hermana 46,XX que presentaba amenorrea, ovarios quísticos de tamaño desigual y útero pequeño. Identificaron la mutación c.1660T>C (p.Arg554X) en el gen *LHCGR* en estado homocigoto (Latronico et al., 1996). (Latronico et al., 1996)(Latronico et al., 1996)Esta mutación generó en el tercer *loop* intracelular del *LHCGR* un codón de parada prematuro que condujo a la interrupción temprana de la traducción del receptor. Aunque la variante no ha sido evaluada mediante ensayos funcionales, es coherente pensar que la mutación pueda alterar la transducción de señales hormonales. En el contexto reproductivo, su presencia en hombres y en mujeres afectadas es indicativo de una potencial patogenicidad (Latronico et al., 1996; Laissue, 2015).

Toledo y colaboradores describieron la mutación *LHCGR* c.1777G>C (p.Ala593Pro) en una mujer con amenorrea, cariotipo 46, XX e hipogonadismo hipergonadotrópico. La validación funcional indicó que la mutación alteraba la estimulación de la adenilil ciclase en respuesta a la gonadotropina coriónica humana (hCG). En los análisis histológicos se detectaron folículos en diferentes estadios de desarrollo. En otro estudio realizado por Latronico y colaboradores se identificó la mutación *LHCGR* c.1822_1827del (p.Leu608_Val609del) en

estado heterocigoto en una mujer 46,XX que presentaba infertilidad y amenorrea. Los análisis funcionales posteriores demostraron que como consecuencia de la mutación se producía una retención intracelular del receptor (Latronico et al., 1998). Finalmente, Stavrou y colaboradores identificaron la variante *LHCGR* c.1060A>G (p.Glu354Lys) en estado homocigoto en una mujer con amenorrea primaria que conducía a la pérdida completa de la función del receptor (Toledo et al., 1996; Stavrou et al., 1998).

4.2.2.3.2.2 *FOXL2*

El gen *FOXL2* codifica para un factor de transcripción de la familia *forkhead* que actúa como un factor fundamental en la diferenciación y en el mantenimiento ovárico. Es expresado desde la determinación sexual hasta la edad adulta (Crisponi et al., 2001).

Como se describió en detalle en el capítulo de la FOP sindrómica se ha reportado que *FOXL2* es también responsable de la forma no sindrómica de FOP. Mediante la validación funcional se estableció que la mutación p.Gly187Asp fue responsable del fenotipo FOP en un caso sin BPES (Laissue et al., 2008).

4.2.2.3.2.3 *NOBOX*

El gen *NOBOX* (*Newborn ovary homeobox gene*) se encuentra localizado en 7q35 y codifica para un factor compuesto por un homeodominio conservado de 60 aminoácidos que actúa como regulador transcripcional. Se ha detectado la expresión de *Nobox* en oogonias de

ratones a los 15.5 dpc y posteriormente en los oocitos durante la foliculogénesis. Varios genes involucrados en la reproducción femenina son regulados por Nobox, incluyendo *Mos*, *Oct4*, *Rfpl4*, *Fgf8*, *Zar1*, *Dnmt1o*, *Gdf9*, *Bmp15* y *H100*. Nobox regula genes blancos directos a través de la unión a elementos de unión al ADN (NBE): TAA/GTTG/A. La ablación de *Nobox* en el ratón *knockout* homocigoto condujo a la pérdida posnatal acelerada del número de oocitos y a la alteración del desarrollo del folículo primordial a folículo primario (Suzumori et al., 2002; Rajkovic et al., 2004; Choi y Rajkovic, 2006).

Qin y colaboradores en 2007 reportaron la primera mutación que relaciona a *NOBOX* con la FOP. Se identificó la variante c.1064G>A (p.Arg355His) en una cohorte de 96 mujeres con FOP provenientes de los Estados Unidos. La variante no fue encontrada en ninguno de los 278 controles y se localizó en el homeodominio de la proteína NOBOX. A través de ensayos de cambio en la corrida electroforética (EMSA), se confirmó que la mutación alteraba el elemento de unión al ADN (NBE) ejerciendo un efecto dominante negativo (Qin et al., 2007, 2015).

Posteriormente Bouilly y colaboradores en el 2011 reportaron 5 mutaciones en *NOBOX* causantes de FOP. Mediante la secuenciación de la región codificante del gen en 178 mujeres con FOP idiopática se identificó una variante de tipo *nonsense* c.907C>T (p.Arg303X) y cuatro variantes de tipo *missense*, c.271G>T (p.Gly91Trp), c.349C>T (p.Arg117Trp), c.1025G>C (p.Ser342Tyr) y c.1048G>T (p.Val350Leu). Todas las variantes se encontraron en estado heterocigoto y no fueron identificadas en las muestras control. Los ensayos funcionales de estas variantes mostraron una alteración en la capacidad de las

proteínas para unirse al ADN y de transactivar el promotor del gen *GDF9* (Bouilly et al., 2011). Posteriormente en el 2015 los mismos autores estudiaron 213 pacientes con amenorrea primaria o secundaria. Mediante la secuenciación de la región codificante completa del gen *NOBOX*, encontraron 3 variantes nuevas c.331G>A (pGly111Arg), c.1112A>C (p.Lys371Thr) y c.1856C>T (p.Pro619Leu). Las variantes identificadas generaban alteraciones en la capacidad de transactivación de los promotores de genes blanco (Bouilly et al., 2015).

4.2.2.3.2.4 *NR5A1*

El gen *NR5A1* también conocido como factor esteroidogénico (SF1) codifica para un miembro de la superfamilia de receptores nucleares. Es un regulador transcripcional de genes que participan en la diferenciación sexual, la esteroidogénesis y la reproducción incluyendo *STAR*, *AMH*, *CYP11A1*, *CYP17A1*, *LH/CGR* e *INHA* (Luo et al., 1994; Lin y Achermann, 2008; Lalli et al., 2013; Qin et al., 2015).

Lourenco y colaboradores secuenciaron la región codificante de *NR5A1* en mujeres 46,XX que presentaban FOP. Detectaron 19 variantes de secuencia, entre ellas: c.877G>A (p.Asp293Asn) en estado homocigoto y c.390delG y c.666delC en estado heterocigoto. Los análisis histológicos realizados sobre las biopsias de ovario, evidenciaron la ausencia de folículos y la presencia de fibrosis en estos órganos (Lourenço et al., 2009).

Entre las mutaciones reportadas en *NR5A1* se encuentran: c.704C>T (p.Pro235Leu), c.768delC (p.Asp257fs) (Suwanai et al., 2013), c.763C>T (p.Arg255Cys) y c.13T>G (P.Tyr5Asp), todas en estado heterocigoto. Estas mutaciones fueron validadas funcionalmente como causales de la FOP no sindrómica e idiopática (N. Camats et al., 2012; Philibert et al., 2013; Suwanai et al., 2013; Jiao et al., 2015).

4.2.2.3.2.5 *BMP15*

EL gen *BMP15* también conocido como *GDF9B* está localizado en el cromosoma Xp11.2 y codifica para una proteína de la superfamilia de factores de crecimiento TGF- β , que son ampliamente expresados durante procesos del desarrollo incluyendo la reproducción femenina. Se ha encontrado expresión de *BMP15* en los oocitos durante distintos estadios de la maduración folicular. La relevancia de *BMP15* en la foliculogénesis se evidenció principalmente por el modelo *knock-out* de *Bmp15*^{-/-} donde las ratonas hembras evidenciaban subfertilidad (Dube et al., 1998; Otsuka et al., 2000; Yan et al., 2001; Chang et al., 2002; Erickson y Shimasaki, 2003; Shimasaki et al., 2004; Persani et al., 2011).

La proteína BMP15 está constituida por un péptido N-terminal de señalización, un prodominio y un péptido maduro (C-terminal). La región madura de BMP15 a través de uniones covalentes forma homodímeros (BMP15:BMP15) y por medio de uniones no covalentes forma heterodímeros (BMP15:GDF9) con la región madura de GDF9. La región madura de BMP15 es liberada al compartimiento extracelular después de modificaciones como la dimerización y el clivaje, para unirse a receptores serina/treonina tipo I y II de las

células de la granulosa (Yan et al., 2001; Chang et al., 2002; Hashimoto et al., 2005; Massagué et al., 2005; Weiss y Attisano, 2013; Dube et al., 2016)

Ensayos funcionales revelaron que los heterodímeros BMP15:GDF9 son más bioactivos que los homodímeros (BMP15:BMP15 o GDF9:GDF9) tanto en el ratón como en el humano. En humanos las mutaciones en *BMP15* han sido asociadas con FOP no sindrómica. Di Pasquale y colaboradores en el 2004 identificaron la mutación *BMP15* c.704A>G (p. Tyr235Cys) en dos hermanas con disgenesia ovárica hipergonadotrópica. Los estudios funcionales demostraron que la mutación condujo a una disminución en la proliferación de las células de la granulosa. Esto sugiere que la acción de BMP15 es necesaria durante la foliculogénesis humana (Di Pasquale et al., 2004; Peng et al., 2013)

4.2.2.3.2.6 FIGLA

El gen *FIGLA* (*factor in the germline alpha*) codifica para un factor de transcripción hélice-*loop*-hélice básico (bHLH) específico de las células germinales que regula la expresión de los genes de la zona pelúcida, así como la expresión de otros genes oocito específicos (Liang et al., 1997; Huntriss et al., 2002; Bayne et al., 2004).

Las proteínas bHLH son un grupo de factores de transcripción altamente conservados entre diferentes especies de mamíferos, que se unen a una secuencia consenso (CANNTG) denominada E-box. Se han identificado algunos genes blancos de *Figla* como *Nlrp*, *Pou5f1*,

Kit y *Exo*, entre otros. En humanos y en ratones *FIGLA* es expresado en la gónada embrionaria y forma heterodímeros con el factor de transcripción 3 (*TCF3*). Las hembras *Figla*^{-/-} evidenciaron infertilidad debido a alteraciones en la formación de los folículos primordiales y a una pérdida acelerada de oocitos luego del nacimiento (Liang et al., 1997; Soyak et al., 2000).

Zhao y colaboradores en el 2008 secuenciaron la región codificante del gen *FIGLA* en 100 mujeres chinas que presentaban FOP. Se detectaron en las pacientes (y no en los controles) las variantes c.15_36del (p.Gly6fsX66) y c.419_421del (p.Asn140del). La mutación p.Gly6fsX66 conduce a la pérdida del marco de lectura y a la síntesis de un producto truncado de 66 aminoácidos. El efecto funcional de esta mutación se relacionó con la haploinsuficiencia. Adicionalmente mediante un estudio de doble híbrido se demostró que la mutación c.419_421 del (p.140delAsn) alteró la unión de *FIGLA* con el dominio hélice-loop-hélice (HLH) del factor de transcripción *TCF3* afectando la formación de los heterodímeros activos *FIGLA-TCF3* (Zhao et al., 2008; Qin et al., 2015).

4.2.2.3.2.7 *STAG3*

El gen *STAG3* (*stromal antigen 3*) codifica para una proteína cohesina que tiene una función fundamental durante la replicación del ADN, la mitosis, la expresión génica y la estabilidad cromosómica permitiendo el correcto emparejamiento y la segregación de los cromosomas homólogos durante la meiosis. Se ha encontrado expresión de *STAG3* en estadios tempranos

de la meiosis en el ovario fetal (Houmard et al., 2009; Bardhan, 2010; Garcia-Cruz1 et al., 2010; Mehta et al., 2013; Ball et al., 2014).

Caburet y colaboradores detectaron una delección de 1pb, (c.968delC) en el gen *STAG3* en estado homocigoto en mujeres afectadas por FOP en una familia consanguínea de origen Palestino. Este estudio constituyó una segunda etapa del clonaje posicional iniciado años antes y que determinó una región del cromosoma 7 asociada al fenotipo. Todos los miembros afectados de la familia presentaron la mutación en estado homocigoto mientras que los miembros no afectados eran portadores heterocigotos. Esta mutación genera un codón de parada prematuro (p.Phe187fs*7). Pero el efecto preciso de la mutación a nivel de ARNm y proteína no se ha evaluado. Funcionalmente se ha establecido que la ablación homocigota del gen *Stag3* en ratones hembra conduce a disgenesia ovárica severa (Caburet et al., 2012, 2014).

4.2.2.3.2.8 *NANOS3*

El gen *NANOS3* pertenece a la familia de genes *NANOS* que son altamente conservados, se expresan en los ovarios y están involucrados en el desarrollo, la supervivencia y el mantenimiento de las células germinales. Existen tres genes homólogos *Nanos* en el ratón. *Nanos3* mantiene la viabilidad de las células germinales primordiales (PGCs). Ratones hembra *Nanos3*^{-/-} mostraron infertilidad debida a ovarios atróficos en los cuales no se detectaron PGCs debido a la apoptosis acelerada durante la embriogénesis (Tsuda et al., 2003; Suzuki et al., 2008; Suzuki y Saga, 2008).

Wu y colaboradores analizaron las regiones codificantes de *NANOS1*, *NANOS2* y *NANOS3* en 100 mujeres chinas con FOP e identificaron la mutación *NANOS3* c.457C>T (p.Arg153Trp) en estado heterocigoto en una mujer de 23 años. Estudios funcionales de p.Arg153Trp evidenciaron que la mutación generó inestabilidad en la proteína NANOS3, lo cual posiblemente condujo a una degradación de la proteína por el sistema *ubiquitin*/proteosoma y a una consecuente disminución de los niveles de NANOS3. Adicionalmente, se demostró por medio de un modelo animal que la población de PGCs es controlada por los niveles de proteína Nanos3 (Wu et al., 2013).

Posteriormente, tras el análisis de una cohorte brasilera de 85 mujeres con FOP se reportó una mutación en *NANOS3* de tipo missense en estado homocigoto c.358G>A (p.Glu120Lys) en dos hermanas con FOP. Ensayos funcionales demostraron que la mutación generaba un aumento de la apoptosis, lo cual sugiere una pérdida del efecto protector contra la apoptosis mediado por NANOS3, produciendo un incremento en la apoptosis de las PGCs (Santos et al., 2014; Qin et al., 2015).

4.3 Matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) actúa como un soporte estructural para los tejidos y proporciona una barrera de aislamiento entre ellos. La MEC es fundamental en funciones celulares como la proliferación, la diferenciación, la migración y la adhesión (Rodgers et al., 2000, 2003a; Davies, 2001). Varios procesos fisiológicos, incluyendo el desarrollo folicular,

la ovulación, la implantación embrionaria, la angiogénesis, la hemostasis y la remodelación ósea, entre otros, requieren la regulación adecuada de los componentes de la MEC. La matriz extracelular está compuesta por diferentes proteínas como las fibronectinas, los colágenos, las lamininas y las elastinas. Las enzimas proteasas con especificidad de sustrato participan en funciones de remodelación y de degradación de la MEC. Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) y el sistema activador de plasminógeno (PA) tienen una función esencial en la remodelación de la matriz extracelular. Además, las células interactúan con la matriz por medio de receptores de superficie celular como las integrinas. Estas uniones permiten transducir múltiples señales intracelulares (Strickland y Richards, 1992; Ny. et al., 1993; Ny et al., 2002; Lu et al., 2011b; Theocharis et al., 2015).

En este capítulo se revisarán brevemente los componentes de la matriz extracelular y su función en la reproducción femenina.

4.3.1 Funciones generales de la MEC

Las funciones de la MEC son ejercidas de forma conjunta y coordinada. Cuando la MEC cambia sus propiedades biomecánicas las células con las que interactúa ejercen diferentes tipos de fuerzas. Adicionalmente, la migración celular se altera ya que los haces de colágeno reticulados que confieren rigidez a la MEC obstaculizan la migración celular. Las MMPs se activan y actúan remodelando la matriz permitiendo la migración celular. Es así como las diferentes funciones de la MEC se sobrelapan para responder a estímulos o requerimientos en los tejidos (Egeblad et al., 2010; Yu et al., 2010).

4.3.1.1 Soporte estructural

Debido a sus propiedades físicas la matriz extracelular actúa como un soporte estructural para los tejidos proporcionando rigidez, porosidad, insolubilidad entre otras. Dependiendo de la composición de la MEC sus propiedades biomecánicas varían. La elasticidad es un factor importante en la diferenciación celular y la función de los tejidos. Los cambios en la elasticidad y la rigidez de los tejidos pueden ser causales de patologías como la aterosclerosis que se produce por una pérdida de la elasticidad de la pared arterial. La MEC ejerce fuerzas mecánicas que pueden cambiar la arquitectura celular, la organización de la cromatina, la expresión génica y las cascadas de transducción de señales. Las células pueden responder a cambios estables o transitorios mediante las propiedades biomecánicas de la MEC (Venter et al., 2001; Daley et al., 2008; Lu et al., 2011b).

4.3.1.2 Migración celular

La migración de las células endoteliales y del sistema inmune depende en parte de la expresión de las MMPs, las cuales actúan en la degradación de la MEC facilitando la migración por el espacio intracelular. La orientación de los componentes de la MEC influye la migración dirigida de las células mediante la potenciación de la señalización del receptor del factor de crecimiento o mediante el refuerzo mecánico de la migración celular (Hinsbergh y Koolwijk, 2008; Friedl y Gilmour, 2009; Egeblad et al., 2010). Además de generar espacios de migración celular la MEC proporciona la fuerza requerida para impulsar el movimiento celular, por medio de las fibras de colágeno linealizadas que

proporcionan rigidez y potencian la migración celular. Dependiendo de los requerimientos celulares, la MEC puede servir como barrera o facilitador de la migración celular. Por medio de receptores de MEC como las integrinas, los receptores de dominio de discoidina, los sindecanos y el CD44 las células se inmovilizan al anclarse a la matriz (Egeblad et al., 2010; Lu et al., 2011b).

4.3.1.3 Señalización celular

La matriz extracelular tiene la capacidad de unirse a una variedad de factores de crecimiento lo cual es determinante para el destino de las células. Los componentes de la MEC pueden potenciar la unión entre receptores y sus factores de crecimiento ligando. Por ejemplo cuando el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) se encuentra inactivo es almacenado en la MEC y se mantiene en latencia hasta que se generan estímulos que conducen a su liberación a través de la proteólisis mediada por MMPs (Dijke & Arthur, 2007; Hynes, 2009; Rozario & Desimone, 2010). La MEC puede unirse a factores de crecimiento de forma selectiva y ayuda a determinar la unión específica entre receptores y ligandos participando en la transducción de señales y actuando como precursores de fragmentos de señalización. Los proteoglicanos versicanos son el blanco de las metaloproteinasas ADAMTS que generan fragmentos de señalización que inducen la muerte celular durante el desarrollo de las extremidades en ratones (Mcculloch et al., 2009). Un gran número de fragmentos funcionales incluyendo la endostatina, la tumastatina, la cantastina entre otros, son derivados de precursores de colágeno tipo IV y XVIII, que son

potentes estimuladores o inhibidores de la angiogénesis (Mott y Werb, 2004; Rhodes y Simons, 2007; Mcculloch et al., 2009).

La MEC puede activar eventos de señalización mediante los dominios endógenos de factores de crecimiento que están presentes en las lamininas y las trombospondinas. Los receptores de MEC como las integrinas y los DDRs son receptores de señales de transducción. La unión de los dominios DDR activa los receptores e inicia una cascada de eventos de señalización. La MEC puede participar dinámicamente en la transducción de señales utilizando también sus propiedades biomecánicas (Lu et al., 2011b).

4.3.1.4 Interacción celular

Las interacciones célula-MEC son recíprocas, de manera que las células constantemente crean rupturas y reordenan componentes de la matriz extracelular. A su vez los cambios en la MEC influyen y regulan comportamientos de las células adyacentes. La dinámica de la MEC en las células y los tejidos es adaptativa según su entorno siendo capaz de responder con rapidez a cambios ambientales sutiles (Lu et al., 2011b).

4.3.2 Componentes estructurales de la MEC y su presencia en el ovario

En el ovario los folículos y el cuerpo lúteo se encuentran en crecimiento continuo y en regresión. En las diferentes etapas del desarrollo folicular ocurren distintos procesos

incluyendo la migración, la división, la especialización, la diferenciación y la muerte celular. La MEC participa en todos estos procesos esenciales para el funcionamiento ovárico (Sawyer et al., 2002). La matriz extracelular es diversa en su composición, y está conformada por componentes enzimáticos y estructurales. Algunas proteínas estructurales como las fibronectinas y las lamininas generan redes conectoras que permiten la unión de otras proteínas de la MEC, y conceden la fuerza y la elasticidad necesarias para los tejidos. Los sistemas de proteasas son los componentes enzimáticos de la MEC que actúan en la remodelación y el mantenimiento de la matriz (Rodgers et al., 2000; Vakonakis y Campbell, 2007; Daley et al., 2008).

4.3.2.1 Lamininas

Las lamininas son proteínas constituidas por tres cadenas: α , β y γ . Existen distintos tipos de lamininas de acuerdo con la agrupación de estas cadenas. Estas proteínas contienen sitios de unión a receptores de superficie celular y a otros componentes como el colágeno tipo IV (Davies, 2001; Lu et al., 2011b). En el contexto ovárico las lamininas generan una red que compone la lámina basal folicular. Se ha detectado la expresión de laminina $\alpha 1$, $\beta 2$ y $\gamma 1$ en la lámina basal folicular en los bovinos. Adicionalmente, se ha demostrado la expresión de lamininas en las células de la granulosa (Zhao y Luck, 1995; Rodgers et al., 2000, 2003a; Davies, 2001; Smith et al., 2002).

4.3.2.2 Colágenos

Los colágenos son una familia de 19 glicoproteínas que tienen una estructura de triple hélice y tres cadenas colágeno envueltas en una triple hélice. Son los componentes principales de la MEC. Las células secretan los precursores del colágeno (e.g. el procolágeno) que son clivados por proteinasas para formar largas fibras de colágeno. En el ovario el reemplazo estructural del colágeno en la teca externa permite la expansión del folículo durante la foliculogénesis. Las capas de colágeno en las células tecales y en el epitelio superficial del folículo son degradadas para permitir la ruptura del folículo. Adicionalmente, la membrana basal que separa las células tecales y las células de la granulosa contienen colágeno tipo IV y lamininas que son degradados para la liberación del ovocito durante la ovulación (Davies, 2001; Smith et al., 2002; Rodgers et al., 2003a).

En el capítulo 4.5 se hará énfasis en la proteína COL6A2 la cual ha sido objeto de estudio durante el desarrollo de esta tesis.

4.3.2.3 Fibronectinas

Las fibronectinas (FN) son proteínas expresadas de forma ubicua en la MEC en una gran variedad de tipos celulares. Están conformadas por dos subunidades tipo I y tipo II unidas por puentes disulfuro. Las FN son codificadas por un solo gen y existen múltiples variantes de *splicing* alternativo. Los dímeros de fibronectina tienen sitios de unión a otras moléculas como el heparán sulfato, los proteoglicanos, las integrinas y los colágenos, de tal manera que las FNs se unen a diferentes componentes de la MEC (Davies, 2001; Larsen et al., 2006).

4.3.2.4 Elastina

Las proteínas elastinas tienen propiedades mecánicas y forman una red de fibras incrustadas en la MEC. La elastina es sintetizada y secretada como un precursor soluble, la tropoelastina, la cual contiene dominios de reticulación y se asocia con otros componentes de MEC para formar fibras elásticas. Estas fibras son estables por la acción de la enzima lisil- oxidasa la cual desamina los aminoácidos lisina y permite que sea un polímero insoluble. Las fibras elásticas son estructuras que son sometidas a fuerzas de estiramiento y conforman una red compuesta de elastina y microfibrillas. Los dominios hidrofóbicos de la elastina confieren las propiedades elásticas de la red (Davies, 2001; Wagenseil y Mecham, 2007).

4.3.2.5 Proteasas de la MEC

4.3.2.5.1 Metaloproteinasas de la MEC

Las metaloproteinasas (MMPs) fueron identificadas por primera vez en 1962 por Gross y Lapiere quienes demostraron la existencia de enzimas que degradaban las fibras de colágeno. Las MMPs son proteasas extracelulares involucradas en procesos de degradación de la matriz extracelular. Esta familia de enzimas se clasifica en cinco subfamilias: collagenasas, gelatinasas, estromelisin, metaloproteasas de membrana (MT-MMP) y otras MMP. Todas difieren según su estructura y especificidad del sustrato (Overall y Lopez-Otin, 2002; Folgueras et al., 2004).

Estructuralmente las MMPs están conformadas por múltiples dominios transmembrana que comparten una secuencia pro-péptido conservada. En la región N-terminal tienen una secuencia señalizadora o predominio seguido del pro-péptido que se elimina por proteólisis,

y un dominio catalítico que contiene la región conservada de unión al zinc constituido por la secuencia de aminoácidos: HEXGHXXGXXHZ. En esta configuración, las tres histidinas coordinan la unión a los iones de Zinc. Esta región facilita el plegamiento de la proteína y facilita la interacción proteína-proteína. Dependiendo del tipo de MMP, estas proteínas pueden contener dominios hemopexina y repeticiones ricas en cisteína en el dominio catalítico. Las MMPs transmembrana tienen un dominio transmembrana, y una región C-terminal hidrofóbica con glico fosfatidilinositol que actúa como señal de anclaje de la membrana (Sagane et al., 1999; Anders et al., 2001; Rao et al., 2003; White, 2003)

A continuación, se presentarán las sub-familias de metaloproteinasas ADAM y ADAMTS, debido a que una proteína perteneciente a la familia ADAMTS es el eje central de esta tesis de maestría, y estas dos sub-familias de proteasas comparten variedad de características.

En el genoma humano se han identificado 21 genes *ADAM* y 24 genes *ADAMTS*. Las proteínas ADAM y ADAMTS son estructuralmente similares y comparten el pro-dominio (PD) que regula la actividad enzimática de las proteasas (Figura 8). Antes de que las proteínas sean transportadas a la membrana celular o secretadas a la MEC el PD es procesado y removido en la red trans-golgi (Sagane et al., 1999; Anders et al., 2001; Rao et al., 2003; Brocker et al., 2009). Las proteínas ADAMs contienen un dominio EGF-like, un dominio transmembrana (TM) que permite el anclaje de la proteína a la membrana celular y una cola citoplasmática (CT) que interviene en la función proteasa en respuesta a diversos mecanismos de señalización celular (Figura 8). Por el contrario, las proteínas ADAMTS no tienen los dominios EGF-like, TM y CT, pero poseen dominios

trombospondina (TSP) que varían desde una repetición hasta 15 repeticiones. Las repeticiones de TSP median entre otras la adhesión celular, la angiogénesis y la apoptosis. Algunas proteínas ADAMTS participan además en diferentes procesos fisiológicos incluyendo la vascularización, el procesamiento del colágeno en la piel, la agregación plaquetaria, la diferenciación gonadal y la foliculogénesis (Brocker et al., 2009; Edwards et al., 2009).

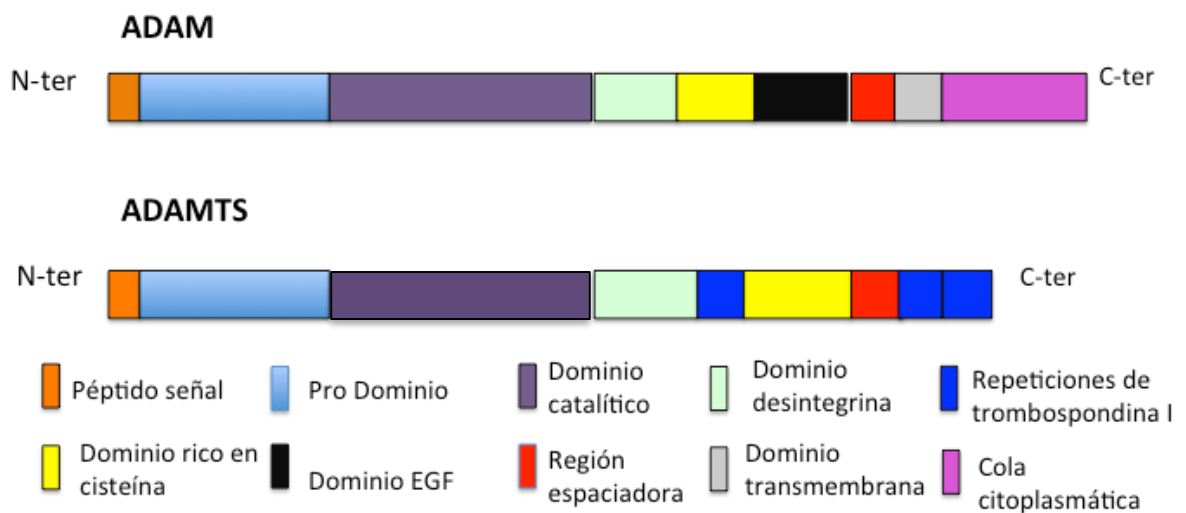


Figura 4. Conformación estructural de las proteínas ADAM y ADAMTS (Modificada de Goor et al., 2010).

Las enzimas MMPs son fundamentales en la remodelación de la MEC, participando en la interacción célula-célula y célula-matriz, y en la liberación de los factores de crecimiento secretados por las células para que puedan unirse a sus receptores. Se han identificado diferentes sustratos de las MMPs, que determinan la especificidad funcional de estas proteinasas. Las MMPs pueden intervenir en procesos como la migración celular, la diferenciación celular, los procesos inflamatorios y la vascularización (Ny et al., 2002; Lu

et al., 2011a). Los inhibidores de proteasas tejido específico TIMPs (*Tissue inhibitor of metalloproteinase*) actúan como reguladores de las metaloproteinasas ya que forman complejos con las MMPs inhibiendo su actividad proteolítica. El dominio N-terminal de las TIMPs es el responsable de la inhibición de las proteasas mientras que el dominio C-terminal actúa en la interacción proteína–proteína. Las proteínas TIMPs son consideradas reguladores cruciales de la remodelación y degradación de la MEC por parte de las MMPs (Baker et al., 2002; Ny et al., 2002; Tousseyn et al., 2006; Edwards et al., 2009; Sterchi, 2009; Goor et al., 2010).

Algunos aspectos adicionales de la familia de ADAMTS, con especial énfasis en ADMATS19 serán descritos más adelante (Ver 4.4.4).

4.3.3 Funciones de la MEC en el desarrollo ovárico de los mamíferos

La remodelación de la MEC es un evento que ocurre en varios procesos fisiológicos durante el desarrollo ovárico en los mamíferos. La remodelación es requerida, durante las diferentes etapas del desarrollo folicular, en la ovulación, en la atresia folicular y en la regresión del cuerpo lúteo. Estos cambios pueden ser mediados por proteasas pertenecientes al sistema activador de plasminógeno (PA) y por las metaloproteinasas de matriz (MMPs). Adicionalmente, el desarrollo folicular requiere cambios en la arquitectura de los tejidos que son controlados por las gonadotropinas pituitarias, por la FSH y por la LH entre otros (Sillem et al., 1998; Ny et al., 2002).

4.3.3.1 MEC en el desarrollo folicular

Durante el proceso de la maduración de los folículos ocurren procesos celulares tales como la proliferación, la diferenciación celular y el remodelamiento de la MEC (Rodgers et al., 2000). La MEC participa en diferentes procesos del desarrollo folicular como la migración, la diferenciación y la muerte celular. La matriz también provee la fuerza osmótica necesaria para la formación del fluido folicular, para la filtración de moléculas solubles y proporciona el soporte elástico y mecánico necesario para el mantenimiento de los tejidos. Los nutrientes, las hormonas y demás señales extracelulares tienen que atravesar la matriz para alcanzar las células blanco. La MEC tiene la capacidad de unirse a los factores de crecimiento de los folículos. Esta unión puede darse de manera directa por algunas proteínas como el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) o de manera indirecta con el factor de crecimiento (*insulin-like growth factor I*) IGF-I donde las proteínas de unión (BP) 2 y 5 o la folistatina se unen a la matriz (Rodgers et al., 2003b).

Durante el desarrollo folicular, ocurre un remodelamiento continuo de la pared folicular. El reemplazo de colágenos estructurales de la teca externa, el estroma y la túnica permiten la expansión del folículo. Particularmente la lámina basal se expande y cambia la composición de las cadenas de colágeno (alfa) tipo IV a las tipo I y II. El recambio de la MEC es un proceso regulado, en donde la degradación y la síntesis de la matriz están compensados. A medida que el folículo aumenta de tamaño, se produce una continua remodelación de la pared folicular. Las enzimas involucradas en la degradación incluyen las MMP 1,2,9 y 13,

los inhibidores de MMP 1 y 2, el PA, y el inhibidor del PA-1 (Curry y Osteen, 2001; Ny et al., 2002; Rodgers et al., 2003b).

En el ovario se encuentran folículos primordiales pequeños que contienen una sola capa de células de la granulosa, que se alinean en la lámina basal folicular. La lámina basal está compuesta por una red de colágeno tipo IV entrelazada en una red de laminina. Su composición está establecida por los tipos de laminina y colágeno tipo IV, lo que determina sus funciones específicas (Yurchenco y Schittny, 1990; Weber. et al., 1992; Zhao y Luck, 1995; Timpl y Brown, 1996; Rodgers et al., 2000, 2003b)

Durante el desarrollo folicular la lámina basal mantiene la polaridad y retrasa la entrada de las proteínas plasmáticas al antro folicular. Adicionalmente, puede contener los proteoglicanos que son sintetizados por las células de la granulosa y que se unen a varios factores de crecimiento. La capacidad de exclusión molecular de la lámina basal le confiere la habilidad de determinar los factores a los que las células de la granulosa y el oocito de encuentren expuestas (Zhao y Luck, 1995; Rodgers et al., 2000, 2003b).

4.3.3.2 MEC en la ovulación

Durante el proceso de ovulación se produce la liberación natural del oocito maduro, como consecuencia del estímulo endocrino mediado por la LH. La degradación proteolítica de la pared folicular es necesaria para la liberación del oocito maduro y hace parte de la cascada

de eventos que ocurren tras el incremento de los niveles de la LH (Hagglund et al., 1999; Ny et al., 2002).

El sistema PA que es inducido por gonadotropinas durante la ovulación, es expresado en diferentes compartimientos ováricos incluyendo las células de la granulosa, las células de la teca y el estroma. La actividad proteolítica que genera la ruptura del folículo seleccionado durante la ovulación es generada por tPA y modulada por PAI-1 (PA-inhibidor tipo I). Las MMPs también han sido implicadas en la ruptura folicular. Las capas de colágeno ovárico en la teca y en la superficie folicular son degradadas antes de la ovulación. Adicionalmente, para la liberación del oocito es requerida la ruptura de la membrana basal que separa las células de la granulosa y las células tecales que contienen principalmente colágeno tipo IV. Las MMPs contribuyen al proceso ovulatorio por su capacidad de activar otras MMPs y de degradar numerosos sustratos. En el ovario la expresión de MMP tipo-1 se encuentra aumentada en folículos preovulatorios bovinos posterior al incremento de la LH (Brannstrom et al., 1988; Strongin A. et al., 1995; Curry y Osteen, 2001).

A partir de modelos murinos KO se ha demostrado que las MMPs son inducidas por señales durante la ovulación (Primakoff y Myles, 2002; Rodríguez et al., 2010). Tras la estimulación por hCG la MT1-MMP y MMP-2 son sobre expresadas en las células de la teca intersticial que rodean los folículos preovulatorios. Adicionalmente, las TIMPs son diferencialmente reguladas durante el periodo preovulatorio. En otras especies, como los ovinos se ha encontrado un incremento en la expresión de TIMP-1 en los folículos preovulatorios posterior al aumento de los niveles de la LH. Los miembros de la familia de proteínas TIMP

probablemente actúan en la regulación de la remodelación de la MEC del ovario durante el periodo preovulatorio (Hagglund et al., 1999).

4.3.3.3 Atresia folicular

La mayoría de los folículos sufren un proceso degenerativo de muerte celular denominado atresia, en el que se observa la destrucción completa de la capa epitelial del folículo (Huet et al., 1997; Rodgers y Ir, 2002). El aumento de la expresión de las MMPs durante la atresia folicular indica que estas proteínas podrían estar involucradas en este proceso. Las proteínas MMPs facilitan la ruptura de la membrana basal que ocurre en las últimas etapas de la atresia. La metaloproteinasa MMP-11 ha sido implicada en procesos apoptóticos en folículos en atresia. Los ratones deficientes de MMP-11 evidenciaron atresia folicular anormal. Esta metaloproteinasa es inducida durante la atresia folicular y puede actuar en conjunto con otras proteinasas en eventos de remodelación de la MEC (Huet et al., 1997; Hagglund et al., 2001).

4.3.3.4 Formación y regresión del cuerpo lúteo

El cuerpo lúteo es formado tras la ovulación inducida por un pico hormonal de LH y la degradación de la lámina basal. Consiste en una población heterogénea de células, incluyendo las células lúteas grandes (LLC) y pequeñas, los fibroblastos, las células endoteliales, los pericitos y las células inmunes (Farin et al., 1986).

El pico preovulatorio de la gonadotropina inicia una cascada de eventos esenciales para el desarrollo del cuerpo lúteo incluyendo la migración de las células endoteliales. La acción de las MMPs de membrana proporcionan un mecanismo para la migración de las células endoteliales durante el desarrollo del cuerpo lúteo (Brooks et al., 1996).

Tras el aumento preovulatorio de la gonadotropina se inicia una cascada de eventos que regulan la transición del folículo preovulatorio a un cuerpo lúteo. La formación y la regresión del cuerpo lúteo involucran la remodelación de la MEC, e implica procesos celulares como la proliferación celular, la migración, la diferenciación celular de las células de la teca y de la granulosa y la muerte celular. Las MMPs y sus inhibidores probablemente participan en dichos eventos celulares. Por ejemplo es probable que en las células lúteas grandes ocurren procesos claves de remodelación de la MEC ya que este tipo celular se ha encontrada como una fuente de MMPs y TIMPs (Smith et al., 2002). Adicionalmente, la MMP progelatinasa A promueve la migración de las células tras el incremento de los niveles de gonadotropina (Liu et al., 1999).

La luteinización es un proceso que lleva a cambios bioquímicos y morfológicos en las células foliculares. La MEC tiene un efecto importante en la diferenciación de los tipos de células incluyendo las células de la granulosa. En ratones se ha identificado que la fibronectina y la laminina promueven la diferenciación de las células de la granulosa en las células lúteas. Además, cambios en la MEC son necesarios para la diferenciación de las células foliculares a células lúteas (Aten et al., 1995). Durante el embarazo el cuerpo lúteo es rescatado por la hCG (hormona gonadotropina corionica humana) y aunque los mecanismos

aún son desconocidos, se ha evidenciado que la supervivencia de las células de la granulosa-lútea depende del contacto con la MEC. Por otro lado, se produce una disminución de la hCG, de la gelatinasa A y un aumento de TIMP-1. La regulación de la expresión de estas proteínas y de la hormona inducen la degradación de la MEC (Stamouli et al., 1996). Finalmente, se presume que la regresión del cuerpo lúteo se da mediante apoptosis y proteólisis. Las proteasas e inhibidores son sobre-regulados durante la formación y la regresión del cuerpo lúteo. Durante este proceso las células involucradas en la luteinización aumentan la expresión de enzimas proteasas (Rodgers et al., 2003b; Irving-Rodgers et al., 2004, 2006). El proceso de luteolisis en los roedores es iniciado por la prostaglandina F2a y se caracteriza por la pérdida del tejido lúteal para dar lugar a la síntesis de progesterona, a la pérdida de la adhesión celular a la MEC, a la apoptosis y a la involución de los tejidos (Nett et al., 1976; Juenguel et al., 1993; Augustin et al., 1995).

4.4 Desintegrinas y metaloproteinasas con motivos trombospondina ADAMTS

Hasta la fecha se han identificado 24 genes que codifican para las proteínas ADAMTS (*disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif*). Estas proteínas comparten similitudes estructurales con la familia ADAM. Las principales diferencias entre estas familias proteicas consisten en que los factores ADAMTS incluyen un dominio trombospondina tipo I (TS), son secretadas a la MEC y clivan procolagenos tipo I, II y III de la MEC (Brocker et al., 2009). Entre otras funciones las proteínas ADAMTS son reconocidas por su capacidad de degradar agregados de proteoglicanos que componen el cartílago articular. Adicionalmente, la familia de ADAMTS incluye las ADAMTSL,

proteínas que carecen de la región PD y MP (figura 4) (Jones y Riley, 2005; Brocker et al., 2009).

A partir de alineamientos de las secuencias de las proteínas ADAMTS humanas, esta familia se ha dividido en 4 grupos principales, de acuerdo a las características estructurales que comparten (Figura 5) (Nicholson et al., 2005).

A continuación, se revisarán brevemente las características principales de la familia de ADAMTS y se detallara sobre la proteína ADAMTS19.

4.4.1 Estructura de las proteínas ADAMTS

Las proteínas ADAMTS tienen un péptido señal seguido hacia N-terminal de una proregión de tamaño variable (Figura 4). El prodominio de las proteínas ADAMTS, a excepción de ADAMTS5, contiene al menos un motivo consenso de escisión de furrina, lugar en el que se produce el clivaje de la forma zimógena de las ADAMTS, lo que ocurre como un proceso de maduración previo a que las proteínas sean secretadas a la MEC. Esto concuerda con los hallazgos encontrados en ADAMTS-4 que demuestran que el prodominio es removido intracelularmente, y que este clivaje es realizado por la proteína furina (Flannery et al., 2002; Wang et al., 2004). El dominio catalítico de las proteasas ADAMTS contiene la secuencia de unión al zinc HEXXHXXGXXH, en la que el zinc catalítico está coordinado por los tres residuos de histidina. Esta disposición es facilitada por la glicina conservada entre los miembros de la familia ADAMTS, lo que conlleva a la formación de un bucle que permite a la tercera histidina ocupar una posición adecuada para la conformación estructural de la proteína (Wolfram et al., 1993; Rawlings y Barrett, 1995). Al igual que en todas las

MMP y las adamalisin, la secuencia de unión a zinc es seguida hacia C-terminal por un residuo de metionina conservado en los miembros de la familia ADAMTS localizado en el sitio activo y que se ha denominado "tipo *metzincin*". Esta metionina constituye el 'bucle de Met' que parece tener una función importante en la estructura del sitio activo (Wolfram et al., 1993).

El dominio de repeticiones de trombospondina (TSR) tipo I de las proteínas ADAMTS se encuentra ubicado entre el dominio desintegrina (Figura 4) y el dominio rico en cisteínas. Al parecer el TSR funciona como un dominio de unión al glicosaminoglicano sulfatado. Todas las proteinasas ADAMTS con excepción de ADAMTS-4 poseen de 1 a 14 repeticiones trombospondina localizados hacia C-terminal después de la región espaciadora (Figura 5) (Kuno y Matsushima, 1998). El dominio rico en cisteínas (CRD) contiene 10 residuos de Cys, hacia C-terminal. Todas las ADAMTS poseen una región espaciadora posterior al CRD, la cual varía de longitud y contiene residuos hidrófobicos conservados en N-terminal así como una región extremadamente variable en C-terminal. En Adamts-1 se describió que la región espaciadora CRD actúa como un dominio funcional de unión a la MEC (Kuno y Matsushima, 1998; Jones y Riley, 2005).

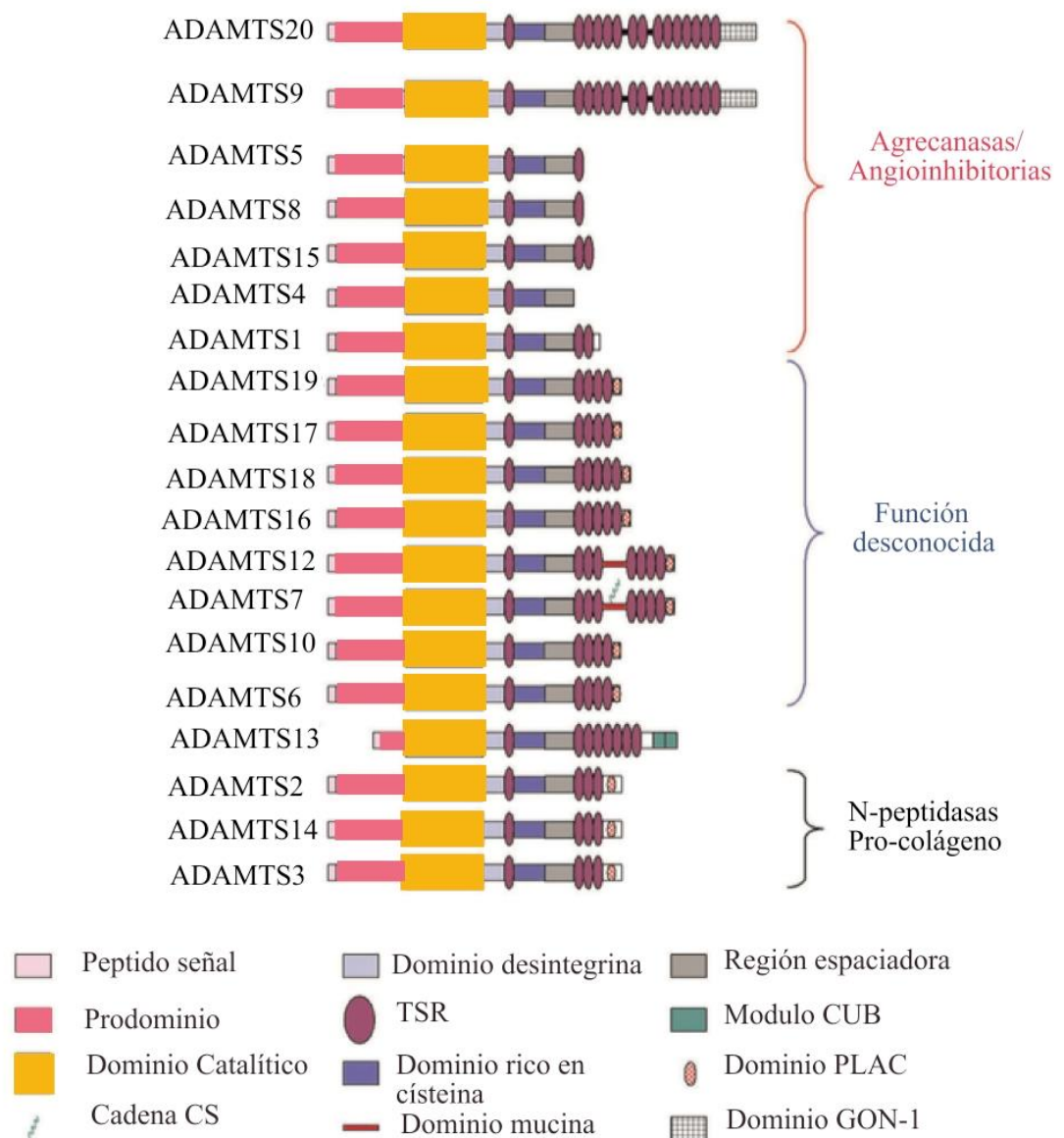


Figura 5. Estructura de las proteínas ADAMTS. Tomado y modificado de Gavin C Jones & Graham P Riley, 2005

4.4.2 Regulación de las ADAMTS

Existen varios mecanismos de regulación de las proteínas ADAMTS, el *splicing* alternativo, por múltiples codones ATG, por el clivaje en el dominio espaciador, o por inhibidores

endógenos. A continuación, se mencionarán algunos de estos procesos de regulación de las ADAMTS. Se ha comprobado que las proteínas ADAMTS son sobreexpresadas en procesos inflamatorios (Jones y Riley, 2005). La regulación post-transcripcional mediante *splicing* alternativo se ha identificado en las proteínas ADAMTS-6, 7 y 9 (Bevitt et al., 2005). Adicionalmente, en el ARNm de ADAMTS-6 se han identificado codones ATG corriente arriba del sitio de inicio de la traducción seguido de marcos abiertos de lectura cortos. Estos reclutan los ribosomas causando una reducción en la traducción de la proteína (Kozak, 2002). En las ADAMTS que son secretadas se producen procesamientos adicionales en la región C-terminal (Manzaneque et al., 2000). Se ha encontrado que en las proteínas ADAMTS-1 y -4 ocurre un clivaje en el dominio espaciador y en ADAMTS-12 el clivaje libera las repeticiones de trombospondina en C-terminal (Manzaneque et al., 2000). Experimentos en modelos celulares han sugerido que estos clivajes son mediados por MMPs (Manzaneque et al., 2000; Gao et al., 2004). En ADAMTS-13 la remoción de la región espaciadora demostró generar una reducción en la actividad de escisión del factor de Von Willebrand. Se ha sugerido que la región espaciadora podría influir en la actividad de los dominios catalíticos de las proteinasas ADAMTS (Soejima et al., 2003; Jones y Riley, 2005).

El inhibidor endógeno de las proteínas ADAMTS es TIMP-3. Otros miembros de la familia TIMP poseen una capacidad inhibitoria reducida (Hashimotoa Yb et al., 2001; Kashiwagi et al., 2001). El inhibidor TIMP-3 se ha encontrado exclusivamente en la MEC (Yu et al., 2000).

4.4.3 Funciones de las proteínas ADAMTS

Las proteínas ADAMTS -1, -4, -5, -8, -9, y 15 han sido denominadas agrecanasas, por su capacidad de escindir el agrecan, un proteoglicano que compone el cartílago. Además, genera resistencia en el tejido y tiene la capacidad de formar agregados proteicos con el colágeno en la matriz extracelular (Pratta et al., 2003). Este grupo de proteínas no está restringido a la escisión de proteoglicanos y puede contener un espectro de funciones más amplio. Las proteínas agrecanasas más estudiadas son ADAMTS-4 y 5, las cuales actúan sobre el brevican, un proteoglicano de condroitin sulfato expresado en el sistema nervioso central al igual que sobre el versican presente en los vasos sanguíneos (Tortorella et al., 2001; Porter et al., 2005). La importancia de la degradación del agrecano en el cartílago se ha relacionado con el desarrollo de artritis debido a que protege las fibras de colágeno de la degradación por enzimas colágenasas (Pratta et al., 2003).

Particularmente, las proteínas ADAMTS -1 y -8 poseen actividad angio-inhibitoria al actuar suprimiendo el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y el factor de crecimiento de fibroblastos -2 (FGF-2). La actividad anti-angiogénica es mediada por las repeticiones de trombospondina (Iruela-arispé et al., 1999).

Las ADAMTS -2, -3 y -14 propeptidasas procolágeno participan en el procesamiento del procolágeno a colágeno. ADAMTS-2 cliva el procolágeno tipo I, II y III. Las mutaciones en *ADAMTS2* se han relacionado con el síndrome Ehlers–Danlos, un desorden del tejido conectivo caracterizado por fragilidad extrema en la piel (Nusgens et al., 1992). En el

modelo murino KO para *Adamts-2* los animales son normales al nacer, pero luego desarrollan fragilidad de la piel. Los machos son infértiles (Li et al., 2001). Adicionalmente, se ha identificado que ADAMTS-3 actúa sobre el procolágeno II y su expresión en la piel es más baja que ADAMTS-2 pero es más alta en cartílago. ADAMTS-14 actúa sobre el procolágeno I (Fernandes et al., 2001). La proteínasa ADAMS-13 es considerada una proteasa de clivaje del factor Von Willebrand (vWF) una proteína que participa en la agregación plaquetaria. La proteasa ADAMTS-13 cliva el factor Von Willebrand inhibiendo su actividad. En humanos la deficiencia de ADAMTS-13 conduce a púrpura trombocitopénica, una enfermedad que presenta gran cantidad de multímeros vWF (Zheng et al., 2001; Scheiflinger et al., 2003).

4.4.3.1 Funciones de las proteasas ADAMTS en la fertilidad

La remodelación de la MEC es importante en el desarrollo de la fertilidad, debido a que en mujeres este proceso facilita la producción cíclica de las células germinales maduras. La remodelación de la MEC involucra diferentes proteasas que participan en su reconfiguración y modulan la localización y la actividad de una serie de ligandos de señalización y sus receptores. Se ha encontrado que varios miembros de la familia de proteasas ADAMTS desempeñan funciones importantes durante el desarrollo de los órganos reproductivos y la vida fértil de adultos (Shindo et al., 2000b).

Durante la gonadogénesis se ha reportado la acción de las enzimas ADAMTS y su participación en la organización estructural de las gónadas en varias especies (Russell et al.,

2014). La expresión de *Adamts19* es elevada en los ovarios de las hembras de ratones en el día E12.5. De manera interesante su expresión elevada no se produce en los testículos. Por consiguiente, la expresión de *Adamts19* corresponde a un marcador temprano de la diferenciación gonadal (Menke et al., 2003; Bouma et al., 2005; Correa et al., 2012). También se ha encontrado que el dominio GON-1 de ADAMTS9 y 20 en *C. elegans* está relacionado con el desarrollo gonadal (Somerville et al., 2003).

A diferencia del ratón, en otras especies (e.g. aves) se ha descrito que durante la diferenciación sexual, la expresión de *Adamts12* está incrementada en los testículos pero no en los ovarios (Carre et al., 2011). *Adamts16* se identificó en testículos y ovarios de roedores en el día E13.5 y en espermátides y células de la granulosa. La importancia de *Adamts16* en el desarrollo testicular se evidenció en ratones machos KO para *Adamts16* que mostraron criptorquidia y esterilidad (Jacobi et al., 2013). Durante la foliculogénesis se ha encontrado expresión de varios miembros de la familia ADAMTS en varias especies de mamíferos. *Adamts1*, 4, 5, 9 y 15 se expresan predominantemente en las células de la granulosa de los mamíferos. La hormona FSH promueve el crecimiento y la supervivencia folicular e induce la expresión de *Adamts1*, 4 y 16, lo que sugiere que estas proteasas están relacionadas con el crecimiento folicular (Freimann et al., 2005; Gao et al., 2007; Doyle et al., 2015). *Adamts1* se expresa en la membrana basal folicular al igual que su sustrato el versican, lo que sugiere que en humanos el clivaje del versican por parte de ADAMTS-1 contribuye a la remodelación estructural del folículo necesaria para su crecimiento y maduración (Gao et al., 2007). Adicionalmente, *Adamts-1* se ha encontrado sobre-expresado en la ovulación en folículos de roedores (Espey et al., 2000). En las células de la granulosa la expresión de

Adamts-1 es dependiente de la expresión del receptor de progesterona (Pgr). Los modelos de ratones KO para *Pgr* evidenciaron fenotipos de infertilidad completa debido a una falla en la ovulación. En estos ratones no ocurre la inducción de la expresión de Adamts-1 en la fase pre-ovulatoria, lo que sugiere que ADAMTS-1 es una proteasa que media la ruptura folicular (Robker et al., 2000).

Los modelos murinos de *Adamts1*^{-/-} evidenciaron subfertilidad y fallo en la ovulación (Mittaz et al., 2004). Estos modelos han permitido encontrar funciones de esta enzima en la foliculogénesis, la linfangiogénesis y la ovulación (Shindo et al., 2000a; Mittaz et al., 2004). La acumulación de ADAMTS1 en el cumulus del oocito es necesario para el clivaje del versican que permite la liberación del oocito (Papers et al., 2003). En ovarios de primates se ha demostrado mayor inducción de ADAMTS4, 9 y 15 durante el periodo preovulatorio. En un estudio realizado en humanos se encontró expresión de *ADAMTS1* y *ADAMTS9* en células de la granulosa durante el periodo pre-ovulatorio y durante etapas tempranas de la ovulación (Rosewell et al., 2014). En ovarios murinos durante el desarrollo temprano se ha encontrado alta expresión de *Adamts19* (Menke y Page, 2002) . Se ha sugerido que ADAMTS19 o genes relacionados pueden tener una función importante en la determinación del número de oocitos retenidos en los folículos que sostienen la vida fértil (Knauff et al., 2009b; Pyun et al., 2013, 2015).

El gen *ADAMTS19* es el énfasis central de esta tesis, por lo cual a continuación se tratará brevemente sobre sus principales características estructurales y estudios relacionados.

4.4.4 ADAMTS19

El gen *ADAMTS19* (*Disintegrin-like and Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif, 19*) se encuentra ubicado en la región cromosómica 5q31. El clon completo del gen fue obtenido a partir de tejido fetal humano (Cal et al., 2002). El gen tiene una longitud de 5234 pb y está conformado por 23 exones codificantes (Cal et al., 2002; Porter et al., 2005). Se ha encontrado expresión de *ADAMTS19* en líneas celulares tumorales humanas en tejido de osteosarcoma y en cartílago articular (Cal et al., 2002; Kevorkian et al., 2004). *ADAMTS19* se ha incluido en el grupo de proteínas ADAMTS “huérfanas” denominadas de esta forma debido a que no se conocen sus sustratos específicos (Porter et al., 2005; Russell et al., 2014).

Los dominios estructurales de la proteína *ADAMTS19* incluyen (de N-terminal a C-terminal), a un péptido señal seguido de un pro-dominio de aproximadamente 200 aminoácidos. El dominio catalítico es de 225 aminoácidos y contiene el sitio activo de la enzima en la región de unión al zinc. El dominio desintegrina-*like* es de 80 aminoácidos y contiene 8 residuos de cisteína. Este dominio potencia la acción proteolítica de la proteína al permitir su unión con receptores integrina de la superficie celular (Porter et al., 2005). Las repeticiones de trombospondina de las ADAMTS se caracterizan por la presencia de tres residuos de triptófano. Las repeticiones de trombospondina están involucradas en la interacción de la enzima con factores de crecimiento y otros componentes de la MEC o de la superficie celular. El dominio rico en cisteína se encuentra relacionado con la localización sub-celular de las proteínas y la especificidad del sustrato (Mochizuki y Okada, 2007;

Tortorella et al., 2009). La región espaciadora está compuesta por 124 aminoácidos. ADAMTS19 cuenta con un dominio auxiliar que contiene cuatro repeticiones de trombospondina y un dominio proteasa-lacunina (PLAC) compuesto por 40 residuos (Cal et al., 2002; Porter et al., 2005; Apte, 2009).



Figura 6. Dominios estructurales de ADAMTS19.

En el 2002 Menke y Page extrajeron ADNc de las gónadas de ratones hembra XX demostrando la expresión elevada de *Adamts19* en el ovario desde el día E12.5 hasta el día E15.5 (Menke y Page, 2002). En estos experimentos la expresión de *Adamts19* predominantemente en el ovario de hembras 8 días postparto y los niveles de expresión fueron más bajos en el riñón, corazón, musculo esquelético, pulmones y testículos. Mediante hibridación *in situ* se encontró expresión abundante de *Adamts19* durante el desarrollo gonadal embrionario (Menke y Page, 2002). Más recientemente se han realizado modelos *knockdown* para *Adamts19* en ratones, los cuales no evidenciaron alteraciones morfológicas o variaciones celulares o en la expresión de genes de la diferenciación gonadal (McClelland

et al., 2015). En un estudio de asociación de genoma completo (GWAS) en el 2009, realizado en 99 pacientes caucásicas con FOP idiopática, se encontró una asociación entre el fenotipo de FOP y un SNP (rs246246) ubicado en el intrón 21 de *ADAMTS19*. Aunque este estudio fue limitado por el tamaño de la muestra, y no fue posible confirmar la asociación en la cohorte de replicación, *ADAMTS19* fue considerado un gen candidato de la FOP (Menke y Page, 2002; Knauff et al., 2009b). Estudios posteriores sugirieron que la epistasis entre polimorfismos en *IGF2R* (*Insulin-like growth factor 2 receptor*) y *ADAMTS19* estaban asociados con la FOP. Se observó que *IGF2R* incrementa la producción de progesterona por parte de las células de la granulosa, mientras que la expresión de diversas proteasas *ADAMTS* es regulada por la progesterona y su receptor (Spicer y Aad, 2007; Fortune et al., 2010). Se realizó un estudio de casos y de controles mediante el análisis de SNPs intra y extragénicos de los genes *IGF2* y *ADAMTS19*. Se determinó que existía una asociación estadísticamente significativa entre diplotipos de estos genes y el fenotipo FOP. Finalmente se sugirió que *ADAMTS19* podría ser regulada por la progesterona y controlada por *IGF2R*, y que la acción sinérgica entre estos genes podría favorecer al desarrollo de la FOP (Pyun et al., 2013). En el 2015 se sugirió que una asociación entre SNPs localizados en *ACVR2B* (*activin A receptor, type IIB*) y en *ADAMTS19* está relacionada con susceptibilidad al desarrollo de la FOP. Se sugirió que *ACVR2B* está involucrada en la producción de progesterona y podría interactuar con *ADAMTS-19* (Pyun et al., 2015).

Nuestro grupo en 2015 identificó, en una paciente FOP, la mutación c.2828C>T (p.Thr943Ile) en *ADAMTS19* mediante experimentos de NGS (Fonseca et al., 2015). La mutación p.Thr943Ile está localizada en el dominio auxiliar de *ADAMTS19*, en la primera

repetición trombospondina (TSR), que se ha asociado funcionalmente con la especificidad a los sustratos, con la regulación de la actividad proteolítica y con la interacción con proteínas y componentes de la matriz extracelular (Apte, 2009; Kelwick et al., 2015).

4.5 COL6A2

El gen *COL6A2* (*Collagen, Type VI, Alpha-2*) está localizado en la región 21q22.3 y está constituido por 28 exones, de los cuales 27 son codificantes. El ADNc es de 3461pb de longitud (Gelse et al., 2003). La proteína COL6A2 pertenece a la familia de colágenos, caracterizados por estar conformadas por estructuras de triple hélice, y por su expresión en MEC, en todos los tejidos de vertebrados e invertebrados. Hasta la fecha 26 tipos de colágeno han sido caracterizados, siendo el principal componente de los tejidos conectivos (Gelse et al., 2003). Estas proteínas han sido involucradas principalmente con la formación y el mantenimiento de redes fibrilares y microfibrilares de la MEC, la membrana basal y otras estructuras de la MEC (Gelse et al., 2003; Maraldi et al., 2009). COL6A2 pertenece al subgrupo de colágenos tipo VI, el cual forma una clase de microfibrillas que se encuentra expresado en la mayoría de los tejidos de los vertebrados. Estas microfibrillas se localizan cerca de las células, de los nervios y de los vasos sanguíneos. Se ha sugerido que tienen una función de anclaje entre células (Bruns et al., 1986; Ayad et al., 1989). Además, el colágeno tipo VI puede estar implicado en la migración y la diferenciación celular, y en el desarrollo embrionario (Otte et al., 1990).

El colágeno tipo VI es un heterotrímero compuesto por tres cadenas diferentes $\alpha 1$ (de 140

kDa), $\alpha 2$ (de 140 kDa) y $\alpha 3$ (de 300 a 340 kDa). En el extremo N-terminal se encuentra el péptido señal seguido hacia C-terminal por un dominio globular N-terminal, el dominio triple hélice y el dominio globular C-terminal (Figura 7). Los dos dominios globulares son de igual diámetro y se ubican a cada lado de las cadenas $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (dominio triple hélice). Están formados por aproximadamente 200 residuos del factor von Willebrand A (VWA), y tienen similitudes estructurales con algunas integrinas y proteínas de la MEC del cartílago (Zhang et al., 2002). Las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ tienen una repetición del dominio globular N-terminal y dos repeticiones del dominio globular C-terminal. La cadena $\alpha 3$ tiene 11 repeticiones del dominio globular, de las cuales nueve se han encontrado en el dominio amino-globular (Lampe et al., 2012).



Figura 7. Estructura de COL6A2

Los dominios globulares participan en las interacciones entre los diferentes componentes de la matriz extracelular y tienen particular importancia en el reconocimiento de la integrina $\alpha 2\beta 1$ la cual regula la adhesión y la diferenciación celular. Al ser secretado a la matriz extracelular, el colágeno tipo VI forma una red microfibrilar en prácticamente todos los tejidos conectivos a excepción del tejido óseo (Silvera y Barrios, 2012).

En el ovario el colágeno tipo VI se ha encontrado en células de la teca durante el desarrollo folicular (Iwahashi et al., 2000). Además, los niveles de expresión de *Col6a2* han sido evaluados durante el crecimiento del antro folicular después de la inducción de la ovulación. Se encontró una expresión incrementada de *Col6a2* en el complejo de cumulus del oocito al final del crecimiento antral y en las primeras horas después de la administración de gonadotropina coriónica humana (Adriaenssens et al., 2009).

Mutaciones puntuales en el colágeno tipo VI han sido relacionadas con fenotipos como la miopatía de Bethlem y la distrofia muscular congénita de Ullrich. La miopatía de Bethlem, se presenta con debilidad muscular proximal y contracturas variables, afectando los flexores de los dedos, los codos y los tobillos. La distrofia muscular congénita de Ullrich es caracterizada por la debilidad congénita e hipotonía, contracturas articulares proximales e hiperlaxitud de las articulaciones distales (Scacheri et al., 2002; Lampe et al., 2012).

5. Preguntas de investigación

- ¿Cuál(es) son lo(s) *partner(s)* proteicos de ADAMTS19 en un contexto ovárico?
- ¿Las proteínas ADAMTS19 y su(s) *partner(s)* proteicos se expresan en líquido folicular humano? ¿Si es el caso, existe una interacción entre ellas?
- ¿Las proteínas ADAMTS19 y su(s) *partner(s)* proteicos son coexpresados en el ovario de ratón?

- ¿La mutación p.Thr943Ile en ADAMTS19 afecta la interacción de ADAMTS19 con su(s) *partner*(s) proteicos asociándose al fenotipo FOP?

6. Objetivos de la Investigación

6.1 Objetivo general

- Identificar nuevos potenciales proteínas de interacción (*partners*) de ADAMTS19.

6.2 Objetivos específicos

- Determinar si las interacciones proteicas de nuevos *partners* de ADAMTS19 se producen en el ovario.
- Establecer nuevas hipótesis sobre la función de ADAMTS19 en el ovario.
- Determinar si la mutación p.Thr943Ile en ADAMTS19 perturba la interacción de ADAMTS19 y su(s) *partner*(s) proteicos y se relaciona con la etiología de la FOP.

7. Materiales y métodos

7.1 Identificación de las proteínas de interacción (*partners*) de ADAMTS19 mediante el sistema de doble híbrido en levaduras

El sistema de doble híbrido en levaduras fue descrito por primera vez en 1989, cuando se inició una nueva era de la investigación de interacciones proteína-proteína. Esta metodología se fundamenta en la reconstitución de un factor de transcripción (FT) funcional seguido de la expresión de un gen reportero en células de levadura genéticamente modificadas (Fields y Song, 1989). El fenotipo permite el crecimiento de las levaduras en un medio selectivo confiere cambios en el color de las colonias de las levaduras (www.hybrigenics-services.com). Dos genes reporteros son comúnmente usados en los ensayos: el *His3*, un gen que permite el crecimiento en un medio carente de histidina y el *LacZ* que permite realizar el tamizaje de las levaduras mediante ensayos de colorimetría (Fields y Song, 1989).

En los experimentos se generan dos proteínas denominados *prey* y *bait*. La primera la proteína *prey* consiste la proteína de interés unida al dominio de unión al ADN del factor de transcripción. La segunda consiste en el dominio de activación del factor de transcripción unido a una proteína que se asume interactuará con la primera. La reconstitución del factor de transcripción permite que se active el gen reportero (Figura 8) (Fields y Song, 1989). El sistema doble híbrido puede evaluar la interacción entre dos proteínas específicas, o usar una proteína de interés como *bait* para hacer un tamizaje con una librería de ADNc proveniente

de tejidos específicos, con la finalidad de identificar *partners* mediante la secuenciación de los plásmidos de las colonias de levaduras seleccionadas.

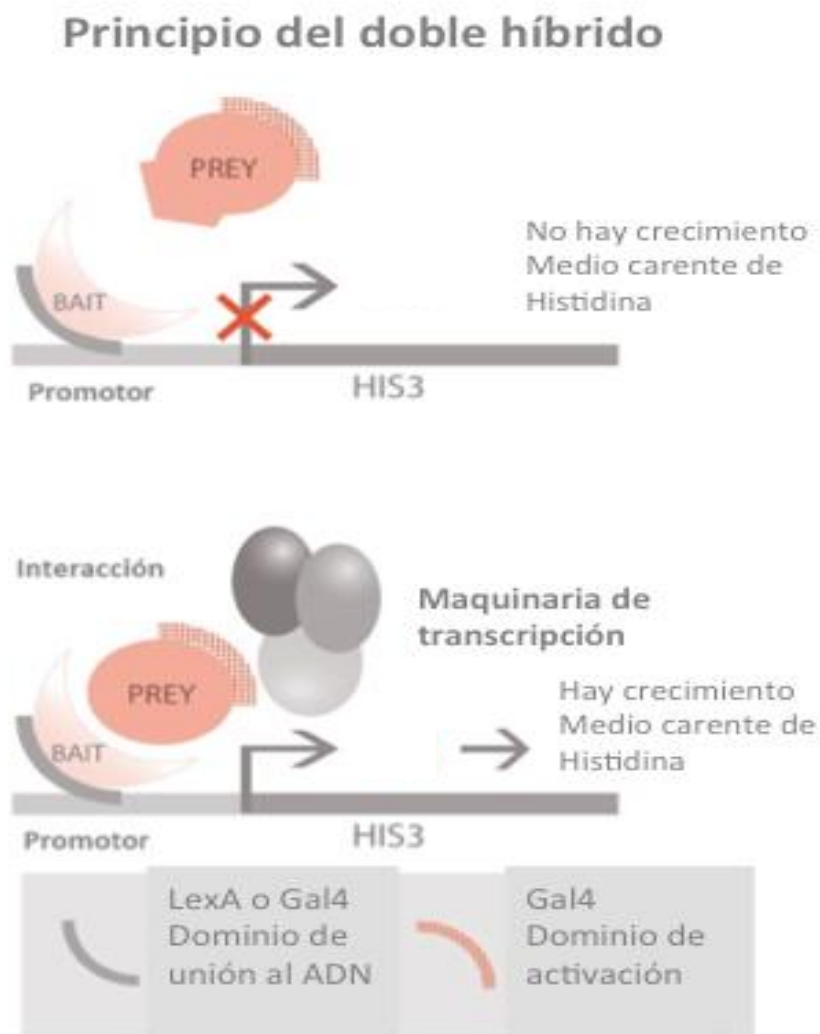


Figura 8. Principio del tamizaje de doble híbrido ULTimate Y2H (Hybrigenics).

Los experimentos de doble híbrido fueron realizados por el laboratorio *Hybrigenics* en París, Francia (www.hybrigenics.com). La proteína “bait” fusionada al dominio de unión de ADN del factor de transcripción, fue generada a partir de clones de ADNc de *Adamts19-Mus*

musculus (Gene ID: 240322) y clonada en el plásmido p27 en la región C-terminal (Nter-LexA-Adamts19-Cter) y en el plásmido pB66 en la región C-terminal (Nter-Gal4-Adamts19-Cter). Las secuencias fueron verificadas por medio de secuenciación directa. La proteína fusión traducida contenía un fragmento de Adamts19 de 535 aminoácidos (aa 637-1172) (Figura 9) donde se encuentran presentes los dominios de Adamts19 correspondientes a: *thrombospondin type 1 repeat* (SM0029 o PF00090), *ADAM-TS Spacer 1* (PF05896) y *PLAC* (PF08686). Este fragmento correspondía a la región homóloga humana en la que se encontró la mutación p.Thr973Ile en una de las pacientes con FOP estudiada por NGS y reportada por nuestro grupo (Fonseca et al., 2015). Las proteínas “prey” fusionadas al dominio de activación del factor de transcripción, fueron generadas de clones de una librería de ADNc de ovario de *Mus musculus* en los vectores p27 y pB66. Un total de 148.2 millones de interacciones fueron evaluadas. Después de la selección sobre el medio deficiente en histidina, los clones positivos fueron elegidos, y los fragmentos correspondientes al “prey” se amplificaron por PCR y se secuenciaron en sus extremos 3’ y 5’.

<i>Homo sapiens</i>	EGEKECRTKLDPPMDGTDCDLGKWKAGECTSRTPAPEHLAGEWSLWSPCSRCSAGISS	655
<i>Mus musculus</i>	EGEAEACRTKLDPPMDGTDCDPGKWKAGECTRRTPAPEHLAGEWSPWSSCSRSCSSGVSS	658
	*** ***** ** ***** ** ** :*:*:**	
<i>Homo sapiens</i>	RERKCPGLDSEARDCNGPRKQYRICENPPCPAGLPGFRDWQCQAYSVRTSSPKHILQWQA	715
<i>Mus musculus</i>	RERKCPGLGSEARDCNGPRKQYRICENPPCPAGLPGFRDWQCQAYSVRTSYPKHALQWQA	718
	***** ***** ***** ***** ** *	
<i>Homo sapiens</i>	VLDEEKPCALFCSFVGKEQPILLSEKVMGDTSCGYQGLDICANGRCQKVGCDGLLGLSLAR	775
<i>Mus musculus</i>	VFDEEKPCALFCSFVGKEQPVLLSEKVMGDTSCGYQGLDICANGRCQKAGCDGLLGLSLAR	778
	*:*****:*****.*****	
<i>Homo sapiens</i>	EDHCGVCNNGKSKIKGDFNHRGAGYVEVLVIPAGARRIKVVEEKPAHSYLALRDAG	835
<i>Mus musculus</i>	EDHCGVCNNGKSKVIKDFNHRGAGYVEVLVIPAGARRIKVVEEKPAHSFLALRDAS	838
	*****:*****:*****.	
<i>Homo sapiens</i>	KQSINSDWKIEHSGAFNLAGTTVHYVRRGLWEKISAKGPTTAPLHLLVLLFQDQNYGLHY	895
<i>Mus musculus</i>	KQSINSDWKIEHSGAFSLAGTTVHYLRGLWEKISAKGPTTTPHLHLLVLLFQDQNYGLHY	898
	*****.*****:*****:*****	
<i>Homo sapiens</i>	EYTIPSDPLPENQSSKAPEPLFMWTHTSWEDCDATCGGGERKTTVSCTKIMSKNISIVDN	955
<i>Mus musculus</i>	EYTVPSDPLPDNQSSKEPGPLFMWTHAGWGDCNATCGGGERKTMVSCTKIMSKNISLVDN	958
	:**:*** * *****:.* *:***** *****:***	
<i>Homo sapiens</i>	EKCKYLTKEPEQIRKNEQPCQTRWMMTEWTPCSRTCGKGMQSRQVACTQQLSNGTLIRA	1015
<i>Mus musculus</i>	KKCKDLTKPEPEQIRKNEQPCQTRWMMTEWTTCSRTCGKGVQSRQVACTQQLENGTLIRA	1018
	:** ***** *****:*****.*****	
<i>Homo sapiens</i>	RERDCIGPKPASAQRCQDQCMVTWEAGVWSECSVKCGKGIHRHTRVRCNTNPRKKCVLSTR	1075
<i>Mus musculus</i>	WERDCLGPKPATVQRCQDQCMVTWEAGVWSECSVKCGKGVHRHTRVRCNTNPRKKCVLSTR	1078
	:**:*****:*****:*****	
<i>Homo sapiens</i>	PREAEDCEDYSKCYVWRMGDWSKCSITCGKGMQSRVIQCMHKITGRHGNECFSEKPAAY	1135
<i>Mus musculus</i>	PREAEDCEDYSKCYVWRVGDWSKCSITCGKGMQSRVIQCMHKITGRHGNECFSEKPAAY	1138
	*****:*****:*****	
<i>Homo sapiens</i>	RPCHLQPCNEKINVTITSPRLAALTFKCLGDQWPVYCRVIREKNLCQDMRWYQRCCECTC	1195
<i>Mus musculus</i>	RPCHLQPCNEKINVTITSPRLAALTFKCLGDQWPVYCRVIREKNLCQDMRWYQRCCECTC	1198

Figura 9. Alineamientos de secuencias de proteína de humano y de ratón correspondientes a ADAMTS19. En amarillo: región proteica de ADAMTS19 humano clonado y utilizado en los experimentos de interacción proteína-proteína. En fucsia: región proteica de Adamts19 de ratón usada en el ensayo de doble híbrido.

Posteriormente, para cada interacción, los resultados fueron expresados como un Puntaje Biológico Predictivo (PBS) que evalúa la fiabilidad de la interacción y que se fundamenta en la comparación entre el número de fragmentos de las proteínas sustrato que interactúa con la proteína de interés y la posibilidad de que estos hallazgos se deban al azar. Los resultados de

la interacción se clasificaron en categorías discriminadas desde la A hasta la F (Tabla 3). La identificación del(os) “*prey*” que establecen interacción proteína-proteína con el “*bait*” permite la definición del SID (Selection Interaction Domain). Este dominio corresponde a la secuencia de aminoácidos específica del “*prey*” necesaria para su interacción con el “*bait*”.

Tabla 3. Categorías de la interacción entre proteínas, según el sistema de *Hybrigenics*, Global PBS.

A	Interacción de muy alta confiabilidad
B	Interacción de alta confiabilidad
C	Interacción de buena confiabilidad
D	Interacción de moderada confiabilidad
E	Interacción de baja confiabilidad
F	Artefacto técnico

7.2 Sistema de doble híbrido en células eucariotas

Debido a que el sistema doble híbrido se realizó con ADNc de ovario de ratón, se buscó comprobar que la interacción se presentara también en proteínas humanas, utilizando

construcciones plasmídicas con ADNc de *ADAMTS19* y *COL6A2*. Con este objetivo, se utilizó el sistema de doble híbrido en células eucariotas *CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System* (CM) (Promega) (Figura 10) y la co-inmunoprecipitación (CoIp) de proteínas. En la aproximación experimental de CM, cada uno de los ADNc que codifican para las proteínas de interés fueron clonados dentro de los vectores pACT (Figura 11) ó pBIND (Figura 12) para generar proteínas fusión, que al interactuar permiten la reconfiguración de un factor de transcripción que se une al promotor *GAL4*. En este sistema, la interacción entre las proteínas de interés resulta en la transcripción del gen reportero de luciferasa *firefly* que se encuentra en el plásmido pG5*luc* (figura 14), y fue cuantificado en unidades relativas de luciferasa (URL).

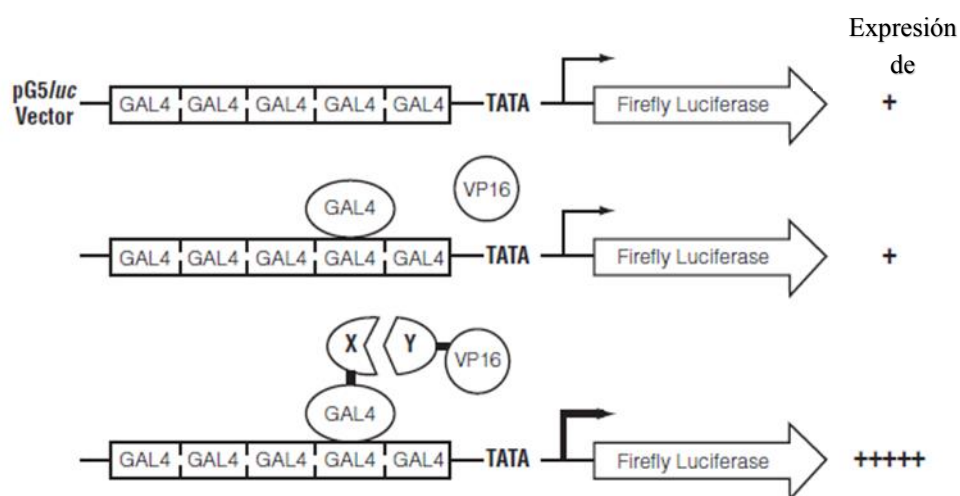


Figura 10. Sistema de doble híbrido en células eucariotas. Tomado de *CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System* (promega).

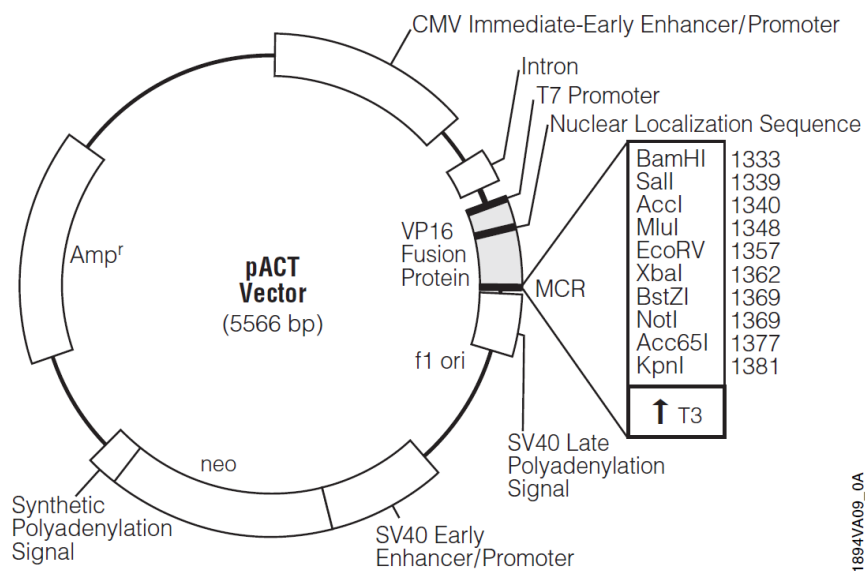


Figura 11. Mapa del vector pACT. Tomado de CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System (promega).

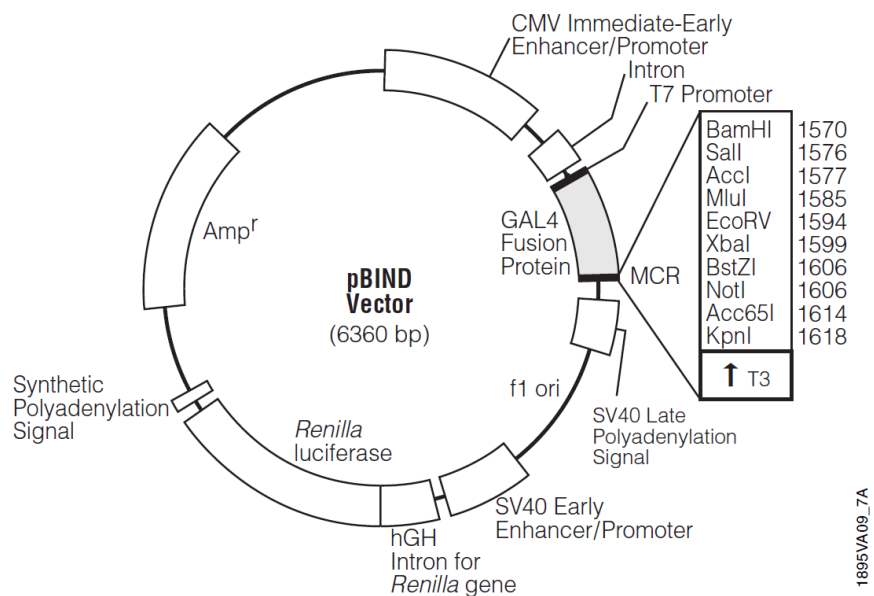


Figura 12. Mapa del Vector pBIND. Tomado de CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System (promega).

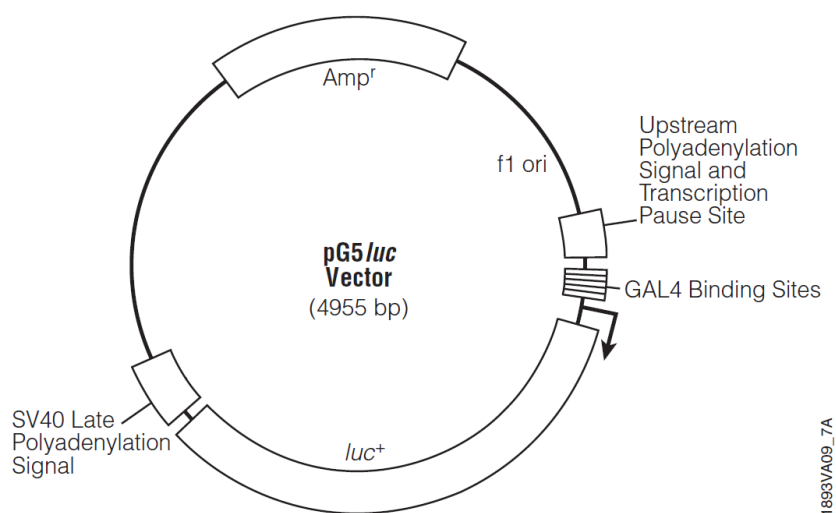


Figura 13. Mapa del vector pG5luc. Tomado de CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System (promega).

7.2.1 Construcciones plasmídicas de *ADAMTS19* y *COL6A2*

La secuencia codificante completa del gen *ADAMTS19* (NM_133638) humano se adquirió en OriGene clonada en el vector pCMV6-AC-GFP. Para la obtención de la región codificante de *COL6A2* humano, se realizó la extracción de ARN total a partir de una muestra de tejido de piel almacenada en trizol (TRIzol® Reagent) siguiendo el protocolo de extracción de ARN.

7.2.1.1 Extracción de ARN de piel

Se adicionó 1mL de trizol (TRIzol® Reagent) a la muestra de biopsia y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir disociación completa del tejido y del

complejo nucleoproteína. Posteriormente se adicionaron 200µl de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Seguido, se Incubó 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000g X 15 minutos a 4°C. Luego se tomó el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo, al cual se le adicionaron 500 µl de isopropanol frio y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, se centrifugó a 13000g X 15 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante.

Posteriormente, se lavó con 1mL de etanol frio al 75% se mezcló con *vortex* y se centrifugó a 7500g X 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante, dos veces. Finalmente, se dejó secar el pellet a temperatura ambiente durante 10 minutos y se adicionaron 10µl de RNAasa *free water* y se resuspendió suavemente, para realizar una incubación final placa seca a 55°C durante 10 minutos. Se cuantificó y se almacenó a -80°C de forma inmediata.

A continuación, se obtuvo el ADNc utilizando el kit *Superscript III First-strand synthesis system for RT-PCR* (Invitrogen REF:18080-051).

7.2.1.2 PCR para clonaje en pCR4

Se realizó una PCR sobre el vector pCMV6-AC-GFP/*ADAMTS19* que contenía la secuencia codificante completa de *ADAMTS19* con dos *primers* que incluían secuencias de reconocimiento para las dos enzimas de restricción SalI (localización en 5' del fragmento amplificado) y NotI (localización en 3' del fragmento amplificado) presentes también en el sitio de clonaje múltiple de los vectores pACT y pBIND (Tabla 4). El producto amplificado correspondía a un fragmento de ADNc de 1608 pb que codificaba 536 aminoácidos de *ADAMTS19* (desde el His⁶³⁴ hasta Trp¹¹⁶⁹ Uniprot *accession number* Q8TE59) e

involucraba el sitio en que se encontró la mutación (p.Thr943Ile) en una paciente con FOP (Fonseca et al., 2015).

Posterior a la síntesis de ADNc a partir de RNA de piel, se amplificó por PCR el ADNc de *COL6A2* con dos *primers* que incluían en sus extremos secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción Sall (localización en 5' del fragmento amplificado) y NotI (localización en 3' del fragmento amplificado) (Tabla 4). El producto amplificado correspondía a un fragmento de 1028 pb que codificaba para 342 aminoácidos de COL6A2 (desde Gly³⁰⁷ hasta Ala⁶⁴⁹ *Uniprot accession number* P12110) e involucraba la región donde se encontraba el SID reportado en el sistema de doble híbrido en levadura (Figura 14). En paralelo se amplificó por PCR el ADNc del gen *house keeping GADPH*.

<i>Homo sapiens</i>	GDPGIEGPIGFPGPKGVPGFK GEKGEFGADGRKGAPGLAGKNGTDGQKGKLGRI GPFGCK	345
<i>Mus musculus</i>	GDPGIEGPIGFPGPKGVPGFKGEKGEFGSDGRKGAPGLAGKNGTDGQKGKLGRIGPFGCK	360
	*****:*****	
<i>Homo sapiens</i>	GDPGNRGPDPGYPGGAGSPGERGDQGGKGDPRPGRRGPPGEIGAKGSKGYQGN SGAPGSP	405
<i>Mus musculus</i>	GDPGSRGPDGYPGGAGSPGERGDQGAKGDSGRPGRRGPPGDPGDKGSKGYQGNNGAPGSP	420
	.**.*** *****: * *****.*****	
<i>Homo sapiens</i>	GVKGAKGGPGPRGPKGEPGRRGDPGT KGSPGSDGPKGEKGD PGPEGPRGLAGEV GNKGAK	465
<i>Mus musculus</i>	GVKGKGGPGPRGPKGEPGRRGDPGTKGGPGSDGPKGEKGD PGPEGPRGLAGEV GSKGAK	480
	.**.*****.*****.***	
<i>Homo sapiens</i>	GDRGLPGPRGPQ GALGEPGKQGSRGDPGDAGPRGDSGQ PGPKGDPRPGFSY PGPRGAPG	525
<i>Mus musculus</i>	GDRGLPGPRGPQGALGEPGKQGSRGDPGDAGPRGDSGQ PGPKGDPRPGFSY PGPRGTPG	540
	*****:***	
<i>Homo sapiens</i>	EKGEFGPRGPEGGRGDFGLKGE PGRKGEKGE PADPGFPGE PGPRGPRGVP GPGE EPGPPG	585
<i>Mus musculus</i>	EKGE PGFPGE GGRGDFGLKGT PRK SDKGE PADPGFPGE PGPRGPRGIPGE EPGPPG	600
	***** ***** *****:*****:*****	
<i>Homo sapiens</i>	DFGLTECDVMTYVRET CGCCDCEKRCGALDVVFID SS ESIGYTNFTLEKNFVIN VNRL	645
<i>Mus musculus</i>	DFGLTECDVMTYVRET CGCCDCEKRCGALDVVFID SS ESIGYTNFTLEKNFVIN VNRL	660

<i>Homo sapiens</i>	GAIA KDPKSETGTRVGVVQYSHEGT FEAI QLD DERID SLSSFKEAVKNLEW IA GGTWTPS	705
<i>Mus musculus</i>	GAI A KDPK SETGTRVGVVQYSHEGT FEAI R LD DERVNSLSSFKEAVKNLEW IA GGTWTPS	720
	*****:*****:*****	

Figura 14. Alineamiento de las secuencias proteicas de humano y de ratón de COL6A2. En amarillo: región de la proteína COL6A2 humana clonada en los ensayos de CM y CoIp. En azul: SID de ratón identificado mediante el ensayo de doble híbrido.

Tabla 4. Primers de amplificación para ADAMTS19 y COL6A2 (secuencias en negrilla correspondientes a la secuencia de restricción).

Gen	Secuencia del primer	
ADAMT S19	Forward	5'
	huADAMTS19-	ACGCGTCGACAAGCACCCGAGCACTTGGCTG

	SalI-fwCheck	GAGAG 3'
	Reverse huADAMTS19-NotI-reCheck	5' ATAAGAATGCGGCCGCACTCTTCTGCTGTAGC TTTTGGGC 3'
COL6A2	Forward huCOL6A2-SalI-F-Check	5' ACGCGTCGACGGAGAGAAGGGTGAATTTGGA GC 3'
	Reverse huCOL6A2-NotI-R-Check	5' ATAAGAATGCGGCCGCAGCGATGGCACCCAG CCTGTTG 3'

Tabla 5. Condiciones de la PCR para el subclonaje en pCR4.

Paso	Temperatura	Tiempo ADAMTS19	Tiempo COL6A2
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos	10 minutos
Desnaturalización	95°C	40 segundos	40 segundos
Anillamiento	57°C	40 segundos	40 segundos
Elongación	72°C	1 minuto 30 segundos	1 minuto
Elongación Final	72°C	10 minutos	10 minutos

Numero de ciclos	25 ciclos
------------------	-----------

Una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X (*Tris/Borato/EDTA*) y 4% de *Bromuro de Etidio* fue realizada para comprobar la amplificación de las secuencias. Posteriormente se realizó un gel preparativo con la finalidad de extraer las bandas de interés mediante el kit *QIAquick® Gel Extraction* (Qiagen).

7.2.1.3 Sub Clonaje del ADNc de *ADAMTS19* y de *COL6A2* en pCR4

Los fragmentos de ADNc de *ADAMTS19* y de *COL6A2* obtenidos a partir de la PCR anterior fueron clonados usando el sistema *TOPO-TA Cloning* (Invitrogen). Para este clonaje se usan productos de PCR con extremos adenilados. La *taq* polimerasa utilizada en la amplificación tiene una actividad terminal no dependiente de la secuencia molde e incorpora el nucleótido deoxiaminidasa (A) al extremo 3' del producto de PCR. El vector linealizado pCR4 tiene un residuo deoxitimidina (T) en el extremo 3'. Esto permite que el producto de PCR (con cola poli A en 3') se ligue de manera eficiente con el vector. Este clonaje se realizó con la finalidad de obtener las construcciones pCR-TOPO4/*ADAMTS19* *wild type* (WT), y pCR-TOPO4/*COL6A2*, con los correspondientes sitios de restricción de las enzimas *SalI* y *NotI* descritos anteriormente.

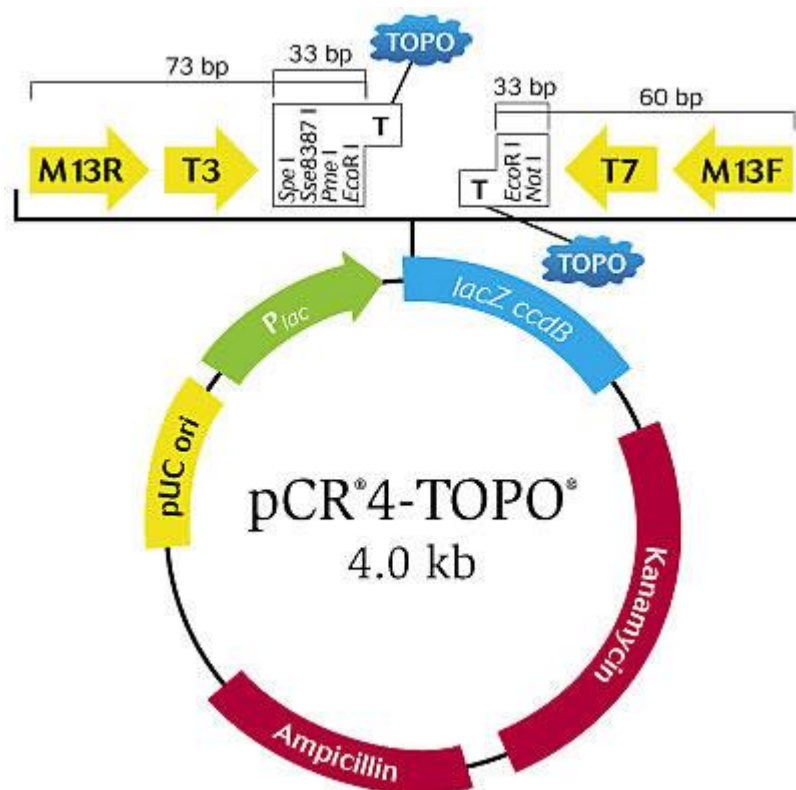


Figura 15. Vector pCR4-TOPO (Invitrogen)

Para la reacción de clonaje en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen) se siguieron las siguientes condiciones (Tabla 6):

Tabla 6. Condiciones del clonaje en pCR4-TOPO

Condiciones del clonaje en pCR4-TOPO		
Reactivos	<i>ADAMTS19</i> - WT	<i>COL6A2</i>
ADN (100ng/μl)	2	2

Vector pCR4-TOPO	1	1
Solución salina	1	1
Agua libre de endonucleasas	2	2

Se incubó el clonaje a temperatura ambiente durante 40 minutos.

7.2.1.3.1 Transformación

La transformación del vector pCR4-TOPO con el inserto clonado se realizó en células *Escherichia coli* quimio-competentes *One Shot TOP10 Competent Cells* (Invitrogen). Se añadieron 2µl del producto de clonaje a 50 µl de bacterias y se incubaron por 30 minutos en hielo. Posteriormente, se realizó choque térmico a 42°C en un baño serológico durante 30 segundos y se conservaron en hielo por 5 minutos. A la anterior mezcla se le adicionaron 250µl de medio S.O.C y se incubó a 37°C en agitación a 250 rpm durante una hora. A continuación, se sembraron 80 µl en placas de agar LB (Thermo Fisher scientific) con ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C.

Al día siguiente las colonias fueron extraídas y sembradas en 5 ml de medio LB con ampicilina y se incubaron a 37°C toda la noche en agitación a 150 rpm y se realizó extracción del ADN plasmídico mediante el protocolo de *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen). Consecutivamente, se realizó PCR de verificación.

7.2.1.3.2 PCR de verificación del clonaje en pCR4

Para verificar el clonaje de los fragmentos en el vector pCR4 se utilizó el *primer T7 forward* y los siguientes oligonucleótidos internos *reverse*.

huCOL6A2_1165R: 5'CCTTGATACCCCTTGCTTCCCTTGG 3'

huADAMTS19_2093R: 5' GGAAGTTCTAACACTATAAGCC 3'

También se usó el *primer M13 reverse* con los siguientes *primers* internos *forward*:

huADAMTS19_3271F: GGCGAATGGGTGACTGGTCTAAGTGC

huCOL6A2_1764F: CTCACGGAGTGTGACGTCATGACC

Tabla 7. Condiciones PCR de verificación del clonaje.

Paso	Temperatura	ADAMTS19 WT/mut	COL6A2 (Tiempo)
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos	10 minutos
Desnaturalización	95°C	40 segundos	40 segundos
Anillamiento	57°C	40 segundos	40 segundos
Elongación	72°C	30 segundos	30 segundos

Elongación Final	72°C	10 minutos	10 minutos
Numero de ciclos	35 ciclos		

7.2.2 Generación de la mutación c.2828C>T de *ADAMTS19* mediante mutagénesis dirigida por PCR

La secuencia codificante completa del gen *ADAMTS19* (NM_133638) humano se encontraba clonada en el vector pCMV6-AC-GFP (OriGene). Se utilizó la técnica de PCR fusión (overlapping PCR) para introducir la variante c.2828C>T en *ADAMTS19* y evaluar su posible efecto funcional en la interacción ente *ADAMTS19* y su *partner*. La técnica consiste en dos rondas de PCR. En la primera amplificación se usaron cuatro *primers* (dos flanqueantes y dos mutagénicos) (Figura 16). En la segunda amplificación los productos de la primera PCR son combinados en una reacción de fusión en la que el extremo 3' solapado de cada hebra, actúa como *primer* de extensión para la hebra complementaria.

Los *primers*, Hu*ADAMTS19*-2828-1R y Hu*ADAMTS19*-2828-1F contenían la mutación en el centro de la secuencia.

Tabla 8. *Primers* para mutagénesis dirigida de *ADAMTS19*, en rojo la variante c.2828C>T.

<i>Primers</i>	Secuencia del <i>primer</i>	
ADAMTS19 Fragmento A	HuADAMTS19Alpha-2F	5'GGGCGAGAAGCCGCGGCCGCGGGA G'
	HuADAMTS19-2828-1R	5' TTTGTGCTCATGATTTTGTACAGGACA CTGTTGTC3'

ADAMTS19 Fragmento B	HuADAMTS19-2828-1F	5'GACAACAGTGTCTCTGACAAAAATC ATGAGCAAAA 3'
	HuADAMTS19Omega-1R	5' GCAGCTTTTGGGCATAGAAGTCCC 3'

El fragmento A correspondió a un producto amplificado de 2899pb y el fragmento B a un producto de 800pb.

Tabla 9. Condiciones de PCR fragmentos A y B

Reactivo	Fragmento A	Fragmento B
ADN plasmídico 100 ng/μl	1μl	1μl
<i>Platinum® Pfx DNA Polymerase</i> (Invitrogen)	12,5 μl	-
<i>GoTaq Green Master Mix</i> (Promega)	-	12,5 μl
<i>Primers</i> (10pg/μl)	2μl (c/u)	2μl (c/u)
DMSO 1%	1,5 μl	1,5 μl
Agua libre de nucleasas	8,5 μl	8,5 μl
Volumen final	25 μl	25 μl

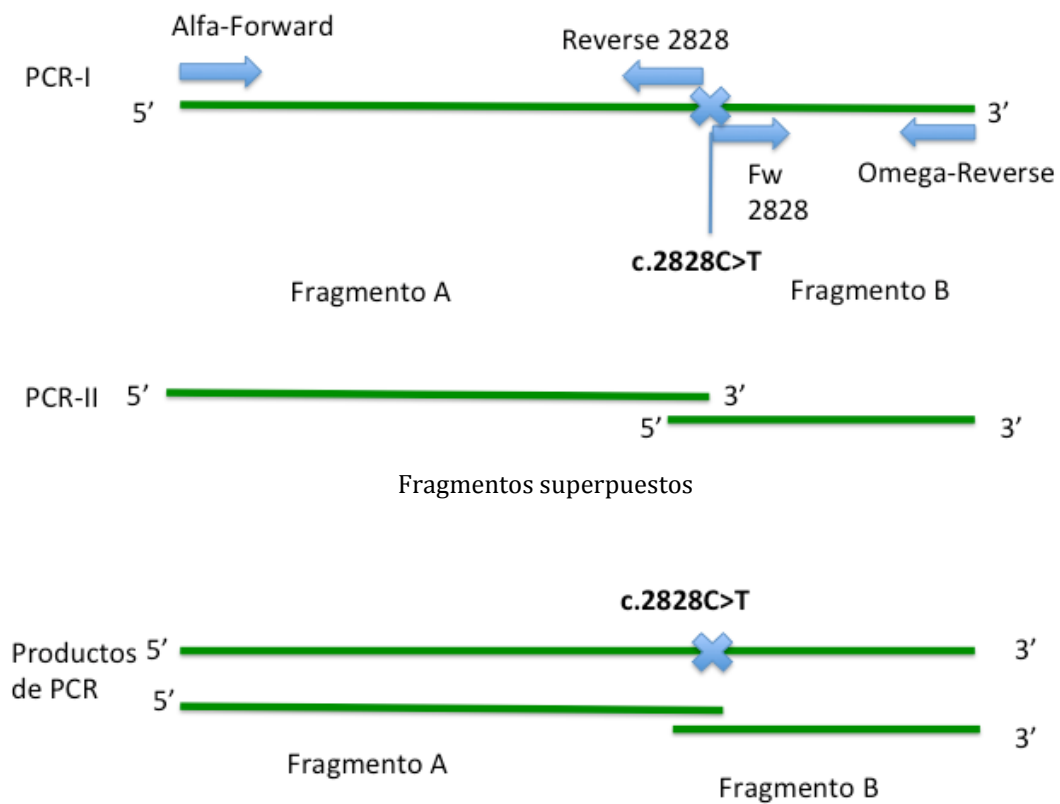


Figura 16. Esquema de mutagénesis dirigida de *ADAMTS19*. Tomada y modificada de (Patel et al., 2009)

Tabla 10. Programa del termociclador para la PCR de amplificación de los fragmentos A y B del gen *ADAMTS19*.

Fragmento A			Fragmento B		
Programa Termociclador		Tiempo	Programa Termociclador		Tiempo
Desnaturalización	94°C	5 minutos	Desnaturalización	94°C	10

inicial			inicial		minutos
Número de ciclos	20 ciclos		Número de ciclos	20 ciclos	
Desnaturalización	95°C	30 segundos	Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	57°C	30 segundos	Anillamiento	57°C	40 segundos
Elongación	66°C	3 minutos	Elongación	72°C	40 segundos
Elongación final	72°C	10 minutos	Elongación final	72°C	10 minutos
Conservación	4°C		Conservación	4°C	

Para la purificación del ADN amplificado por PCR se realizó un gel preparativo de agarosa al 1% en buffer TBE 1X (*Tris/Borato/EDTA*) teñido con bromuro de etidio seguido de electroforesis del producto amplificado. Las bandas correspondientes a los fragmentos A y B fueron extraídas y purificadas usando el kit *QIAquick® Gel Extraction* (Qiagen).

7.2.2.1 PCR fusión

Posteriormente, se realizó una segunda ronda de PCR en la que los fragmentos A y B purificados se mezclaron. La reacción se realizó con 12 µl del fragmento A, 3 µl del fragmento B, 10 µl de H₂O y 25 µl de *Platinum® Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen).

Tabla 11. Programa del termociclador para la segunda ronda de PCR

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®		TIEMPO
Desnaturalización Inicial	94°C	2 minutos
# ciclos	2 ciclos	
Desnaturalización	94°C	1 minuto
Anillamiento	47°C	1:30 minutos
Elongación	66°C	3:40 minutos
# Ciclos		2
	94°C	1 minuto
	49°C	1:30 minutos
	66°C	3:40 minutos
# Ciclos		2
	94°C	1 minuto
	51°C	1:30 minutos
	66°C	3:40 minutos
# Ciclos		2
	94°C	1 minuto
	51°C	1:30 minutos
	66°C	3:40 minutos

# Ciclos		4
	94°C	1 minuto
	55°C	1:30 minutos
	66°C	3:40 minutos
# Ciclos		4
	94°C	1 minuto
	57°C	1:30 minutos
	66°C	3:40 minutos
Elongación Final	72°C	5 minutos

Posteriormente se extrajo la banda del producto con la secuencia completa de ADNc de *ADAMTS19* mutado de un gel preparativo. Este producto fue secuenciado para verificar la introducción de la mutación (c.2828C>T) en *ADAMTS19*.

7.2.3 Clonaje del ADNc de *ADAMTS19* c.2828C>T en pCR-XL-TOPO

El fragmento de ADNc de *ADAMTS19* mut (c.2828C>T) obtenido anteriormente fue clonado usando el kit TOPO® XL PCR *Cloning Kit* (Invitrogen), basado en el sistema TA-*cloning* explicado en el numeral 7.2.1.3.

Tabla 12. Reacción de clonaje TOPO® XL PCR.

Reactivo	Volumen
ADNc de <i>ADAMTS19</i> mut	2 µl
Solución Salina	1 µl
Agua	2 µl
Vector pCR-XL-TOPO	1 µl
Incubación a temperatura ambiente por 40 minutos	

Para la transformación del producto de clonaje se añadieron 3µL del producto en 25µL de células de *Escherichia coli* quimio competentes *One Shot® TOP10 Competent Cells* (Invitrogen). Se siguió el protocolo de transformación previamente descrito. Las colonias resultantes tras la incubación fueron añadidas en 5 ml de medio de cultivo LB con kanamicina durante toda la noche en agitación a 37°C. Se realizó PCR sobre colonia con un *primer forward* T7 que se une al plásmido y un *primer* interno (reverse) que alinea con un fragmento específico de *ADAMTS19*.

Primer interno de *ADAMTS19*:

huADAMTS19-1639R: 5'GCGGATTTGTTTGTAGCAAGCAG 3'

Tabla 13. Condiciones PCR de verificación del clonaje.

Paso	Temperatura	Tiempo

Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos
Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	57°C	40 segundos
Elongación	72°C	1 min y 30 seg
Elongación Final	72°C	10 minutos
Numero de ciclos	35 ciclos	

Posteriormente, a las colonias positivas se les extrajo el ADN plasmídico utilizando el protocolo *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) y se enviaron a secuenciación con *primers* internos y sobre el vector.

7.2.4 Generación del amplicón de *ADAMTS19* c.2828C>T

Para la generación del producto amplificado de *ADAMTS19* c.2828C>T se realizó una PCR sobre el vector pCR-XL-TOPO que contenía el fragmento de ADNc de *ADAMTS19* c.2828C>T y se siguió la metodología descrita en el numeral 7.2.1.2 de igual forma a como se realizó para la versión WT de *ADAMTS19*. Con la finalidad de generar los sitios de restricción necesarios para el clonaje en pACT. Posteriormente el fragmento de ADNc de *ADAMTS19* mut (1608pb) obtenido de la PCR se clonó en el vector pCR4-TOPO y se transformó siguiendo la metodología descrita en 7.2.1.3. Para finalmente obtener la

construcción pCR-TOPO4/*ADAMTS19*-mut (c.2828C>T) con los correspondientes sitios de restricción de las enzimas SalI y NotI.

7.2.5 Clonaje del fragmento de *ADAMTS19* WT, *ADAMTS19* mut y *COL6A2* en los vectores pACT y pBIND mediante el método de digestión/ligación enzimática.

7.2.5.1 Digestión con enzimas de restricción

Las construcciones plasmídicas pCR-TOPO4/*ADAMTS19* WT, pCR-TOPO4/*ADAMTS19* mut y pCR-TOPO4/*COL6A2* con los sitios de restricción en 5' y 3', y los vectores pACT y pBIND se sometieron a un proceso de digestión con las enzimas de restricción SalI y NotI. Se usó el NEBuffer 3.1 en el cual ambas enzimas presentan una actividad del 100% (*New England BioLabs*).

Tabla 14. Condiciones de digestión

Condiciones de la digestión <i>ADAMTS19</i>- WT/<i>ADAMTS19</i> mut/<i>COL6A2</i> y pACT y pBIND	
Buffer 3.1 (10X)	10µl
SalI (20U)	1µl
NotI(10U)	2µl

Agua	67µl
Producto a digerir 100ng/µl	20µl

Se incubó la digestión a 37°C durante 4 horas. El producto final de digestión fue evaluado en un gel preparativo de agarosa al 1% en buffer TBE 1X (*Tris/Borato/EDTA*) y posteriormente se realizó la extracción de las bandas correspondientes con el kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen).

7.2.5.2 Ligación de los fragmentos *ADAMTS19* WT, y *ADAMTS19* mut, en el vector pACT y de *COL6A2* en el vector pBIND

Para la ligación de los fragmentos y vectores digeridos se empleó la enzima T4 ligasa (Invitrogen) la cual liga los fragmentos de ADN a través de enlaces covalentes. Los cálculos de ligación se hicieron teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$ng\ Inserto = \frac{100ngvector \times \text{tamaño del inserto (pb)}}{\text{Tamaño vector}} \times 3$$

Tabla 15. Cálculos para la ligación de *ADAMTS19* WT, y *ADAMTS19* mut, en el vector pACT y de *COL6A2* en el vector pBIND.

Cálculos	<i>ADAMTS19</i> /WT (<i>Sall</i> - <i>NotI</i>)	<i>ADAMTS19</i> /mut	<i>COL6A2</i> (<i>Sall</i> -	PBIND	pcDNA3
----------	--	----------------------	----------------------------------	-------	--------

		<i>(Sall-NotI)</i>	<i>NotI</i>		
ng de inserto calculados	86	86	48	100	100
Concentración producto de extracción de banda (ng/μl)	29	27	22	36,8	32,08
Cantidad utilizada en la ligación(μl)	3,5	3,5	2,5	3	3

Tabla 16. Condiciones de reacción de las ligaciones de pACT y *ADAMTS19* WT, pACT y *ADAMTS19* mut y pBIND y *COL6A2*.

Condiciones de la reacción de ligación			
Reactivos	<i>ADAMTS19/WT</i>	<i>ADAMTS19/mut</i>	<i>COL6A2</i>
Buffer T4 ligasa	4μl	4μl	4μl
Inserto	3,5μl	3,5μl	2,5μl
Vector pACT ó pBIND	3μl	3μl	3μl
T4 ADN ligasa (1U/μl)	2μl	2μl	2μl
Agua	7,5μl	7,5μl	8,5μl
Incubación 16 horas a 16°C			

7.2.5.3 Transformación

Se realizó la transformación siguiendo el protocolo de transformación descrito previamente, utilizando 2 µl del producto de ligación y 25 µl de bacterias *Escherichia coli* quimio-competentes One Shot® TOP10 Competent Cells (Invitrogen).

Las colonias resultantes tras la incubación del producto de transformación en las placas de agar LB-amp fueron añadidas a 5mL de medio de cultivo LB-Amp toda la noche a 37°C en agitación de 150 rpm. Se realizó PCR de las colonias con la finalidad de verificar la ligación de los fragmentos en los vectores pACT (*ADAMTS19 WT* y *mut*) y pBIND (*COL6A2*). Se utilizó un *primer forward* T7 EVV que se hibrida al plásmido y un *primer* interno (reverse) que se hibrida con un fragmento específico de las dos versiones de *ADAMTS19* y una segunda combinación de *primers* usando un *primer forward* T7 EVV con un *primer* interno (reverse) para *COL6A2*.

Primers de PCR de verificación:

huCOL6A2_1165R: 5'CCTTGATACCCCTTGCTTCCCTTGG 3'

huADAMTS19_2093R: 5' GGAAGTTCTAACACTATAAGCC 3'

Estas PCRs se realizaron con el objetivo de verificar la adecuada ligación de los fragmentos en los vectores correspondientes. Las construcciones plasmídicas fueron enviadas a secuenciación con *primers* internos y sobre el vector. Una vez comprobado que el inserto se clonó adecuadamente en los vectores se realizaron midipreps empleando el kit QIAprep *Spin Midiprep* (Qiagen) y se conservaron a -20°C.

7.2.6 Co-transfección de las construcciones plasmídicas

Las células CHO (Chinese Hamster Ovary) fueron sembradas 24 horas antes de la transfección, se utilizaron cajas de 24 pozos (80.000 células por pozo) y medio DMEM-F12 con 10% SFB (Suero Fetal Bovino) y Pen/strep (Penicilina/Streptomicina) 1% (Invitrogen-Gibco). Las células se encontraban en confluencia del 80% al momento de la transfección.

Se siguieron las recomendaciones del protocolo de transfección de CM (promega) de mantener una proporción de 1:1:1 (200ng) para cada uno de los constructos en la transfección. Simultáneamente se co-transfectaron los vectores pACT-MyoD y pBIND-Id que correspondían a los controles positivos. Estos plásmidos codifican y expresan dos proteínas que interactúan *in vivo*. Se usaron los vectores pACT y pBIND vacíos como control negativo. Las co-transfecciones se llevaron a cabo al menos tres veces en sextuplicado. Para transfectar se utilizó el lípido catiónico FuGENE6 *Transfection reagent* (Promega) y OpTIMEM (medio libre de SFB y Antibiótico) (Thermo Fisher scientific). Siguiendo las recomendaciones del inserto, se calculó la cantidad de ADN (μg) y FuGENE6 (μl) necesarios para mantener una proporción de 1:3 (Tabla 17).

Tabla 17. Cálculos de la transfección. (C+) control positivo. (C-) control negativo.

Mezcla	Construcción 1	Construcción 2	pG5luc	Fugene (μL)	Optimem (μl)	n
1	ADAMTS19WT/ pACT(100ng/ μl) 12 μl	COL6A2/ pBIND (100ng/ μl)12 μl	(100ng/ μl)12 μl	9,75	95,9	6

2	<i>ADAMTS19</i> mut/ pACT(100ng/μl) 12μl	<i>COL6A2</i> / pBIND (100ng/μl)12μl	(100ng/μl)12 μl	9,75	95,9	6
3	pACT/mio (C+) (100ng/μl) 12μl	pBIND/Id (C+) (100ng/μl) 12μl	(100ng/μl)12 μl	9,75	95,9	6
4	pACT vacío (C-) (100ng/μl) 6	pBIND vacío (C-) (100ng/μl) 6	(100ng/μl)6μ l	4,87	47,9	3

Adicionalmente, se usó como control células no transfectadas, a las cuales se les realizó extracción de ARN para evaluar si las células CHO expresaban ADAMTS19 y COL6A2.

7.2.6.1 Protocolo de transfección

Se realizó la primera mezcla de FuGENE (Promega) y OptiMEM (Thermo Fisher Scientific) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se adicionó el ADN calculado para mantener la proporción 1:3 con el FuGENE, se mezcló y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el medio DMEM (Invitrogen-Gibco) a cada caja de 24 pozos y se reemplazó por 600μl/pozo de medio OptiMEM (Thermo Fisher scientific). De la mezcla de transfección se adicionaron 25 μl a cada pozo y se incubó a 37°C durante 48 horas para permitir la expresión proteica.

7.2.7 Ensayo: Dual-Luciferase Reporter Assay System

Se empleó el protocolo *Dual Luciferase Reporter Assay System* (promega) para cuantificar la cantidad de Renilla y *firefly* luciferasa. Se retiró el medio de cultivo de los pozos y se agregó 1ml de PBS1x a cada pozo y se lavó en *rocket*. A continuación, se retiró el PBS 1x 7 y se adicionaron 100 µl de buffer de lisis 1X a cada pozo, para incubar a temperatura ambiente a 120 rpm durante 1 hora. Posteriormente, se realizó un raspado de las células en cada pozo, y el producto se trasladó a tubos *ependorf* (Lisado).

Paralelamente, en tubos *ependorf* nuevos se agregaron 100µl del reactivo de ensayo de luciferasa II (LAR II) y se transfirieron 20 µl del lisado celular y se mezcló pipeteando 2 a 3 veces. Luego se realizó la lectura en un luminómetro GloMax® 20/20 y se registró la medición de la actividad de *firefly* luciferasa. Se retiró la muestra del luminómetro y se añadieron 100 µl del reactivo *Stop & Glo*®. Después se mezcló suavemente y se volvió a colocar la muestra en el luminómetro para realizar la lectura y se registró la actividad de Renilla luciferasa. Los resultados fueron reportados en unidades relativas de luciferasa (URL) y la significancia estadística fue estimada con la prueba t-Student.

7.3 Co-inmunoprecipitación

Ensayos de co-inmunoprecipitación (CoIp) se realizaron para confirmar la interacción entre ADAMTS19 y COL6A2. Este ensayo es ampliamente utilizado en la detección de interacciones proteína-proteína. La técnica de inmunoprecipitación (IP) permite el aislamiento de una proteína específica a partir de un extracto celular mediante un anticuerpo específico. La co-inmunoprecipitación es una variante de la IP en la cual clásicamente se inmunoprecipita una de las proteínas (que interactúa con otra) que arrastra la otra proteína

que conforma el dímero de interacción. Una vez se ha unido el dímero a un anticuerpo específico (anticuerpo primario) varias centrifugaciones permiten obtener el complejo inmune capturado el cual es desnaturalizado en condiciones de pH bajo. Posteriormente se disocia el complejo para analizar las proteínas mediante electroforesis en SDS-page y revelado mediante WB dirigido a la otra proteína que conforma en dímero de interacción proteína-proteína (Kaboord y Perr, 2008).

7.3.1 Construcciones plasmídicas

7.3.1.1 Subclonaje en pCR4-TOPO

A partir de las construcciones utilizadas para el ensayo de CM se realizó PCR con los *primers* listados en la tabla 18 para generar los amplicones en los de restricción para las enzimas XbaI (localización 5' de los fragmentos amplificados) y HindIII (localización 3' de los fragmentos amplificados). Los fragmentos amplificados corresponden al ADNc de *ADAMTS19* desde 1900pb hasta 3507pb (longitud 1608pb) (*ADAMTS19* desde el aminoácido His⁶³⁴ hasta Trp¹¹⁶⁹ *Uniprot accession number* Q8TE59) en versión WT y mut (c.2828C>T) y la secuencia del ADNc de *COL6A2* desde 919pb hasta 1947pb (longitud 1029pb) (*COL6A2* desde el aminoácido Gly³⁰⁷ hasta Ala⁶⁴⁹ *Uniprot accession number* P12110) correspondiente al SID resultante del ensayo de doble híbrido.

Tabla 18. *Primers ADAMTS19 y COL6A2* para construcciones de co-inmunoprecipitación.

En negrilla la secuencia de restricción.

GEN	Nombre del primer	Secuencia del primer 5'-3'
<i>ADAMTS19</i>	h <i>ADAMTS19</i> _XbaI/ Forward	CTAG TCTAG ACCACCATGGGCCATCTGGCCG GAGAGTGGAGCCTGTGG
<i>ADAMTS19</i>	h <i>ADAMTS19</i> _HindIII /Reverse	AGCTTGA AGCT TTTTTTTTCACCACTGATCTCC CAGGCACTTGAAAG
<i>COL6A2</i>	h <i>COL6A2</i> _XbaI/ Forward	CTAG TCTAG ACCACCATGGGAGAGAAGGG TGAATTTGGAGCCG
<i>COL6A2</i>	h <i>COL6A2</i> _HindIII/ Reverse	AGCTTGA AGCT TTTTTTTCAAGCGATGGCA CCCAGCCTGTTGACC

Tabla 19. Condiciones PCR para la generación de los amplicones *ADAMTS19* y *COL6A2*.

Paso	Temperatura	<i>ADAMTS19</i> WT/mut (Tiempo)	<i>COL6A2</i> (Tiempo)
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos	10 minutos
Desnaturalización	95°C	40 segundos	40 segundos
Anillamiento	57°C	40 segundos	40 segundos

Elongación	72°C	1 minuto 30 segundos	1 minuto
Elongación Final	72°C	10 minutos	10 minutos
Numero de ciclos	25 ciclos		

Al comprobar la amplificación de las secuencias en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X (*Tris/Borato/EDTA*) se realizó extracción de banda y purificación de la misma mediante el kit *QIAquick PCR purification* (Qiagen). Se clonó el fragmento de *ADAMTS19*-WT, *ADAMTS19* Mut y *COL6A2* obtenido mediante PCR en un vector pCR4-TOPO (Invitrogen) según el protocolo previamente descrito en el numeral 7.2.1.3 usando el sistema *TA-cloning*.

Tabla 20. Condiciones de clonaje en pCR4-TOPO.

Condiciones del clonaje en pCR4-TOPO			
Reactivos	<i>ADAMTS19</i> -WT	<i>ADAMTS19</i> mut	<i>COL6A2</i>
ADN (100ng/μl)	2	2	2
vector pCR4-TOPO	1	1	1
Solución salina	1	1	1
Agua libre de endonucleasas	2	2	2

Se incubó el clonaje a temperatura ambiente durante 40 minutos.

7.3.1.2 Transformación

La transformación del vector pCR4-TOPO con el inserto clonado se realizó en células *Escherichia coli* quimio-competentes *One Shot TOP10 Competent Cells* (Invitrogen). Siguiendo el protocolo de transformación previamente descrito.

Para verificar el clonaje de los fragmentos en el vector pCR4-TOPO se utilizó el primer T3 *forward* y los siguientes *primers* internos *reverse*:

huCOL6A2_1165R: 5'CCTTGATACCCCTTGCTTCCCTTGG 3'

huADAMTS19_2093R: 5' GGAAGTTCTAACACTATAAGCC 3'

También se usó el primer M13 con los siguientes *primers* internos *forward*:

huADAMTS19_3271F: 5' GGCGAATGGGTGACTGGTCTAAGTGC 3'

huCOL6A2_1764F: 5' CTCACGGAGTGTGACGTCATGACC 3'

Tabla 21. Condiciones PCR de verificación del clonaje.

Paso	Temperatura	ADAMTS19 WT/mut (Tiempo)	COL6A2 (Tiempo)
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos	10 minutos
Desnaturalización	95°C	40 segundos	40 segundos

Anillamiento	57°C	40 segundos	40 segundos
Elongación	72°C	20 segundos	20 segundos
Elongación Final	72°C	10 minutos	10 minutos
Numero de ciclos	35 ciclos		

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar con la finalidad de verificar el clonaje.

7.3.1.3 Digestión

Las construcciones pCR4-TOPO/*ADAMTS19*-WT, pCR4-TOPO/*ADAMTS19* mut, y pCR4-TOPO/*COL6A2* y el vector pcDNA3 (Invitrogen) (Figura 17) fueron digeridas con las enzimas de restricción XbaI y HindIII en el NEBuffer 2.1 en el presentan 100% de actividad (*New England BioLabs*).

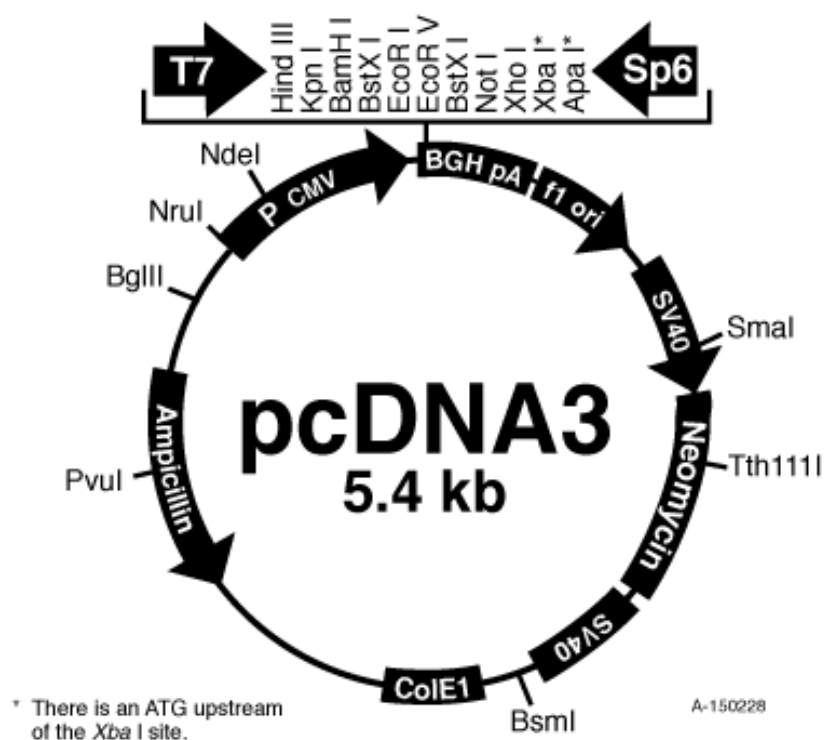


Figura 17. Mapa del vector pcDNA3 (Invitrogen).

Tabla 22. Condiciones de la digestión enzimática pCR4-TOPO/*ADAMTS19*-WT, pCR4-TOPO/*ADAMTS19* mut, y pCR4-TOPO/*COL6A2* y el vector pcDNA3 (Invitrogen).

Condiciones de la digestión enzimática	
Buffer 2.1 (10X)	10µl
XbaI (20U)	1µl
HindIII (20U)	1µl
Agua	68µl
Producto a digerir 100ng/µl	20µl

Se incubó la digestión a 37°C durante 4 horas. El producto final de la digestión se evaluó en un gel preparativo de agarosa al 1% en buffer TBE 1X (*Tris/Borato/EDTA*) y posteriormente se realizó la extracción de las bandas correspondientes con el kit *QIAquick PCR Purification* (*QIAGEN*).

7.3.1.4 Ligación

Para el proceso de ligación de los fragmentos digeridos (*ADAMTS19*-WT, *ADAMTS19* mut y *COL6A2*) en el vector pcDNA3.0 (Invitrogen) se empleó la enzima T4 ligasa (Invitrogen).

Los cálculos de ligación se hicieron teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$ng\ Inserto = \frac{100ngvector \times \text{tamaño del inserto (pb)}}{\text{Tamaño vector}} \times 3$$

Tabla 23. Cálculos para ligación enzimática

Cálculos	<i>ADAMTS19</i>WT	<i>ADAMTS19</i>mut	<i>COL6A2</i>	pcDNA3
ng de inserto calculados	89	89	57.1	100
Concentración producto de extracción de banda (ng/μl)	19	25	19	56
Cantidad utilizada en la ligación(μl)	5	4	3	2

Tabla 24. Condiciones de reacción de ligación enzimática de pcDNA3.

Condiciones de la reacción de ligación enzimática			
Reactivos	<i>ADAMTS19</i> WT	<i>ADAMTS19</i> mut	COL6A2
Buffer T4 ligasa	4µl	4µl	4µl
Inserto	5µl	4µl	3µl
Vector pcDNA3	2µl	2µl	2µl
T4 ligasa (1U/µl)	2µl	2µl	2µl
Agua	5µl	8µl	9µl
Incubación 16 horas a 16°C			

7.3.1.5 Transformación

Se realizó la transformación siguiendo el protocolo de transformación explicado previamente, utilizando 2 µl del producto de ligación y 25 µl de bacterias *Escherichia coli* quimio-competentes One Shot® TOP10 Competent Cells (Invitrogen).

Las colonias resultantes del proceso de incubación de las placas de agar LB-amp con el producto de transformación fueron añadidas a 5mL de medio de cultivo LB-Amp toda la noche a 37°C en agitación de 150 rpm. Se realizó PCR de las colonias con la finalidad de verificar la ligación de los fragmentos al vector pcDNA3.0 con los siguientes *primers*:

hADAMTS19_2311F:

5' GGCTGTGATGGTTTATTAGGGT 3'

hADAMTS19_2957R:

5' GTGAACAAGGGGTCCATTCTGTC 3'

huCOL6A2_1764F:

5' CTCACGGAGTGTGACGTCATGACC 3'

hCOL6A2_HindIII-R:

5' AGCTTGAAGCTTTTTTTTCAAGCGATGGCACCCAGCCTGTTGACC 3'

Tabla 25. Condiciones de la PCR de verificación.

Paso	Temperatura	<i>ADAMTS19</i> WT/mut (Tiempo)	<i>COL6A2</i> (Tiempo)
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos	10 minutos
Desnaturalización	95°C	40 segundos	40 segundos
Anillamiento	57°C	40 segundos	40 segundos
Elongación	72°C	1 minuto	20 segundos
Elongación Final	72°C	10 minutos	10 minutos
Numero de ciclos	35 ciclos		

Las construcciones plasmídicas fueron enviadas a secuenciación con *primers* internos y sobre el vector. Una vez comprobado que el inserto se hubiera clonado adecuadamente en los vectores se realizaron midipreps empleando el kit *Plasmid DNA Purification* (QIAGEN).

7.3.2 Co-transfección de las construcciones plasmídicas

Las células CHO (Chinese Hamster Ovary) fueron sembradas 24 horas antes de la transfección. Se utilizaron cajas de 24 pozos (80.000 células por pozo) y medio DMEM (Invitrogen-Gibco) con 10% SFB y Pen/strep 1%. Las células se encontraban en confluencia del 80% al momento de la transfección.

Se mantuvo una proporción de 1:1 (200ng) para cada uno de los constructos en la transfección. Como control negativo se usaron células NT (no transfectadas) y vectores vacíos. Las co-transfecciones se llevaron a cabo al menos tres veces en sextuplicado. Para transfectar se utilizó el lípido catiónico FuGENE6 *Transfection reagent* (Promega) y OpTIMEM (medio libre de SFB y Antibiótico) (Thermo Fisher scientific). Siguiendo las recomendaciones del inserto de FuGENE6, se calculó la cantidad de ADN (μg) y FuGENE6 (μl) necesarios para mantener una proporción de 1:3 (Tabla 26). Se realizó el protocolo de transfección como se describió en el numeral 7.2.6.1.

Tabla 26. Cálculos de la transfección para CoIp.

Mezcla	Construcción 1 (ng)	Construcción 2 (ng)	Fugene (μl)	Optimem (μl)	Numero de pozos

1	<i>ADAMTS1</i> WT/pcDNA3 (300ng)	<i>COL6A2</i> /pcDNA3 (300ng)	43.2 μ l	412.8 μ l	24
2	<i>ADAMTS1</i> mut/pcDNA3 (300ng)	<i>COL6A2</i> /pcDNA3 (300ng)	43.2 μ l	412.8 μ l	24

Antes de la transfección se evaluó microscópicamente la confluencia de las células y se realizó el siguiente protocolo en el que se utilizó en medio OptiMEM (libre de SFB y antibiótico) (Thermo Fisher scientific) y el FuGENE6 (Promega).

7.3.3 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas totales se realizó 48 horas luego de la transfección. Se retiró el medio de cada pozo y se lavó con 500 μ l de PBS 1X frío. Posteriormente, se retiró el PBS 1X y se añadieron 20 μ l de RIPA (PMSF, Ortofonadato de Sodio, coctel inhibidor de proteasas) (Santa cruz) por pozo. Las cajas se mantuvieron a 4°C por 15 minutos. A continuación, se realizó el raspado de las células y se transfirió el lisado celular a un tubo *Eppendorf*. Después se pasó el lisado celular 5 veces a través de una jeringa de calibre 21G y se mantuvo en hielo durante 40 minutos. Finalmente se centrifugó a 1000g/4°C durante 20 minutos y se alicuotó el sobrenadante (lisado) y se almacenó a -80°C.

7.3.3.1 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el kit *BCA Protein Assay Reagent* (Pierce Biotechnology). Se obtuvieron las siguientes concentraciones:

Tabla 27. Cuantificación de extracción de proteínas en células transfectadas (M1 y M2) y células no transfectadas.

Mezcla	Cuantificación de proteínas
M1	923,107 µg/µl
M2	937,189 µg/µl
Células no transfectadas (NT)	831,503 µg/µl

7.3.4 Inmunoprecipitación

Con la finalidad de eliminar uniones inespecíficas durante la CoIp se utilizó el kit *ImmunoCruz™ IP/WB Optima D System* (Santa Cruz) y el kit *ImmunoCruz™ IP/WB Optima E System* (Santa Cruz). Este sistema permite la eliminación de la detección de cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo de inmunoprecipitado. Las matrices *ImmunoCruz™ IP/WB* se unen al anticuerpo primario, permitiendo que en el revelado del WB solo se evidencien los antígenos detectados por el anticuerpo primario.

Se adicionaron 50µl de la matriz IP (Santa Cruz) y 5µg del Ac primario: anti ADAMTS19 *goat polyclonal IgG* (Sc21513 Santa Cruz) o anti COL6A2 *mouse monoclonal IgG1* (Sc 374566 Santa Cruz) y 500 µl de PBS 1X (Tabla 27). Se mantuvo la mezcla a 4°C durante 1 hora. A continuación, la mezcla fue centrifugada a 22.000g durante 30 segundos a 4°C y se aspiró y descartó el sobrenadante. Posteriormente, se realizaron dos lavados del pellet con 500µl de PBS 1X. Del lisado de proteínas previamente obtenido y cuantificado se

transfirieron 500µg de proteínas a la matriz resultante preparada anteriormente y se incubó a 4°C en rotación, durante toda la noche.

Al día siguiente se centrifugó el tubo a 22.000g durante 30 segundos a 4°C, y se aspiró y se descartó el sobrenadante. Luego se hicieron 4 lavados con 500µl de PBS 1X y el pellet fue resuspendido en 40-50 µl de buffer laemmli (Sigma Aldrich) con Beta mercaptoetanol 2X. Finalmente las muestras se almacenaron a -20°C para su posterior análisis por Western Blot (WB).

Tabla 28. Mezclas de CoIp. Matrices inmunocruz, anticuerpos de CoIp y anticuerpos primarios usados en WB.

Tubo #	MEZCLA	Inmunocruz	Anticuerpo primario CoIp	Anticuerpo primario WB
T1	<i>ADAMTS19</i> WT+ <i>COL6A2</i>	Optima D	Anti <i>ADAMTS19</i>	Anti <i>COL6A2</i>
T2	<i>ADAMTS19</i> mut+ <i>COL6A2</i>	Optima D	Anti <i>ADAMTS19</i>	Anti <i>COL6A2</i>
T3	<i>ADAMTS19</i> WT+ <i>COL6A2</i>	Optima E	Anti <i>COL6A2</i>	Anti <i>ADAMTS19</i>
T4	<i>ADAMTS19</i> mut+ <i>COL6A2</i>	Optima E	Anti <i>COL6A2</i>	Anti <i>ADAMTS19</i>

NT5	Células No transfectadas	Optima D	Anti ADAMTS19	Anti COL6A2
NT6	Células No transfectadas	Optima E	Anti COL6A2	Anti ADAMTS19

7.3.4.1 Western Blot

Los productos de la co-inmunoprecipitación fueron analizados mediante WB. Se preparó el gel de separación al 10% (tabla 28), se adicionó en los montajes de vidrio y se cubrió con isopropanol. Posteriormente se añadió el gel de concentración al 5% y se puso el peine de 10 pozos hasta la gelificación completa.

Tabla 29. Preparación de geles de WB.

Componente	Gel de separación	Gel de concentración
Agua destilada	4.1 ml	5.7 ml
Acrilamida-Bis acrilamida 30%	3.3 ml	1.7 ml
Buffer de separación 10%	2.5 ml	-
Buffer de concentración 5%	-	2.5 ml
APS 10%	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	10 µl
SDS 10%	100 µl	100µl

A continuación, se colocó el gel en el dispositivo para geles de la cámara de electroforesis y se llenó la cámara con el buffer de corrido 1X. Las mezclas de co-inmunoprecipitación se calentaron a 96°C durante 5 minutos, se centrifugaron a 15000 rpm a 4°C durante 5 min y se sembraron 25µl de las mezclas de CoIp en los pozos de las mezclas según el mapa de siembra (figura 18). Adicionalmente, se colocaron 5 µl de patrón de peso (pp). La electroforesis se realizó a 100v hasta que las muestras pasaron al gel de separación y se aumentó el voltaje a 120V durante 2 horas.

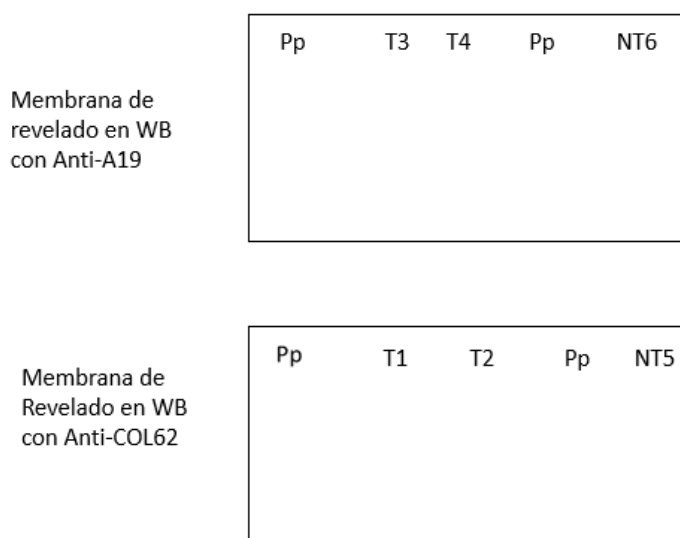


Figura 18. Mapa de siembra WB-co-inmunoprecipitación post-transfección. Pp (patrón de peso de proteínas).

7.3.4.2 Transferencia

Las membranas de PVDF fueron cortadas y se sumergieron en metanol, luego en agua y luego en buffer de transferencia 1X durante 2 minutos. A continuación, se armó el *casette* de transferencia y se montó en la cámara con buffer de transferencia 1X.

La electroforesis fue realizada a 30V durante toda la noche a 4°C.

7.3.4.3 Inmunodetección

Se desmontó la transferencia y el *sandwich* y la membrana fue colocada en TBS (*Tris-buffered saline*). Inmediatamente, se realizó el bloqueo de la membrana. Para el Ac primario monoclonal anti COL6A2 *mouse monoclonal IgG1* (Sc 374566 Santa cruz) se bloqueó con BSA 3% (albumina sérica bovina) y para el anticuerpo anti-ADAMTS19 *goat polyclonal IgG* (Sc21513 Santa cruz) se bloqueó con leche descremada al 5%. Ambas soluciones de bloqueo se prepararon en TBS-T 1X (*Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20*). Se adicionaron 15ml de la solución de bloqueo a la membrana según el anticuerpo primario a usar en el WB (ver tabla 27) y se dejó en agitación orbital a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, se lavó la membrana 3 veces con 10mL de TBS-T 1X. Cada lavado fue de 10 minutos y se mezcló en *shaker* a 160 rpm a temperatura ambiente.

Los anticuerpos primarios de WB se prepararon de la siguiente manera: anti COL6A2 *mouse monoclonal IgG1* (Sc 374566 Santa cruz) 1:400 en BSA 1% y anti-ADAMTS19 *goat polyclonal IgG* (Sc21513 Santa cruz) 1:200 en leche descremada al 2%. Se agregaron 10 ml del anticuerpo primario a la membrana según el mapa de siembra (fig1) y la tabla 12, y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación orbital.

En seguida se realizaron 3 lavados con 10mL de TBS-T 1X durante (10 minutos cada uno) y se mezcló en *shaker* a 160 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente se preparó el anticuerpo secundario para COL6A2 anti *mouse IgG peroxidasa* A9044 (Sigma Aldrich)

1:80.000 en BSA1% y para ADAMTS19 anti *goat IgG peroxidasa* A5420 (Sigma Aldrich) 1:80.000 en leche descremada al 2%. Se adicionaron 10ml del anticuerpo secundario según el mapa de siembra (Figura 18) y las mezclas de CoIp (Tabla 27) y se incubaron las membranas durante dos horas a temperatura ambiente en agitación orbital.

Se realizaron 2 lavados con 10mL de TBS-T 1X durante (10 minutos cada lavado) y se mezcló en *shaker* a 160 rpm a temperatura ambiente. Adicionalmente se realizó otro lavado en agua destilada por 1 minuto 30 segundos a temperatura ambiente sin agitación.

Para el revelado del WB se utilizó el *kit super signal-TM West pico* (Thermo Fisher scientific). Se preparó la solución de revelado y se adicionó en la membrana hasta cubrirla completamente durante 10 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz.

Finalmente se retiró la solución de revelado y se procedió al revelado de la membrana durante 20 minutos en el equipo *Thermo Scientific TM MYECLTM Imager* (Thermo Fisher Scientific).

7.4 Inmunofluorescencia indirecta

La técnica de inmunofluorescencia indirecta se realizó para la verificación de la producción y la potencial colocalización de las proteínas producidas en los ensayos postransfección para CM y para CoIp. Para este ensayo se usaron las mismas construcciones descritas en los pasos 7.2 y 7.3.

7.4.1 DIA 1

Se esterilizaron las laminillas en luz UV durante 60 minutos y se colocaron en las cajas de cultivo de 24 pozos y luego se sembraron las células CHO después de ser tripsinizadas siguiendo los cálculos a 50.000 células por pozo, en cajas de cultivo de 24 pozos.

7.4.2 DIA 2

Se realizó la transfección de las células siguiendo las indicaciones de los pasos 7.2.6 (CM) y 7.3.2 (CoIp). Las células no transfectadas fueron sembradas para evaluar la expresión endógena basal de ADAMTS19 y COL6A2.

7.4.3 DIA 4 (48 horas después de la transfección)

Se revisó la confluencia de las células y se retiró el medio. Adicionalmente, se realizó un lavado con 500µl de PBS 1X mezclando en agitador *rocket*.

7.4.3.1 Fijación

Se agregaron 300µl de PFA (paraformaldheído) en cada pozo en PBS 1X al 4% (Ph 7,4-7,5) durante 2 minutos a 37°. Se realizaron 4 lavados en agitador *rocket* con 500 µl de PBS 1X de 5 minutos cada uno.

7.4.3.2 Permeabilización

Se adicionaron 200µl de tritón 1X (Sigma Aldrich) al 1% a cada pozo durante 5 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Se realizaron 3 lavados en *rocket* con 500µl de PBS 1X (5 minutos cada uno).

7.4.3.3 Bloqueo

Se agregaron 400µl de BSA al 1% en PBS1X en cada pozo, y se incubó a 37°C por 30 minutos. Se realizaron 4 lavados en un agitador *rocket* con 500µl de PBS 1X (de 5 minutos cada uno).

7.4.3.4 Incubación con anticuerpos

Se agregaron 50µl del anticuerpo primario correspondiente (tabla 30). Cuando fue necesario adicionar los dos anticuerpos primarios para la evaluación de la potencial colocalización se adicionaron 25µl de cada uno y se incubó toda la noche a 4° C en cámara húmeda.

Tabla 30. Anticuerpos usados en IFI.

Proteína	Ac primario	Ac Secundario
ADAMTS19	Anti ADAMTS19 <i>goat polyclonal IgG</i> (sc 21513, dilución 1:300, Santa Cruz Biotechnology, Inc).	<i>Donkey anti goat IgG</i> -CFL594 (sc 362275, dilución 1:250 Santa Cruz Biotechnology, Inc)
COL6A2	Anti COL6A2 <i>mouse monoclonal IgG1</i> COL6A2 (sc 374566, dilución 1:300, Santa Cruz Biotechnology, Inc)	<i>Goat anti-mouse IgG</i> CFL48 (sc 362257, dilución 1:250, Santa Cruz Biotechnology, Inc)

Tabla 29. Anticuerpos usados en IFI.

7.4.4 DIA 5

Se realizaron 6 lavados con 500µl de PBS 1X, agitando durante 5 minutos cada uno. A continuación, se adicionaron 50 µl de anticuerpo secundario (Tabla 29). Cuando fue necesario adicionar dos anticuerpos secundarios para potencial colocalización se adicionaron 25µl de cada uno. Se incubaron 2 horas a 4°C en cámara húmeda.

Posteriormente, se realizaron 6 lavados con 500µl de PBS 1X (5 minutos cada uno y protegido de la luz), en agitación en *rocket*. Para el montaje en las láminas portaobjetos se usaron 5µl de líquido de montaje *UltraCruz Mounting Medium* (Santa Cruz Biotechnology, Inc) con DAPI para tinción nuclear. Los montajes se sellaron con esmalte y se guardaron a 4°C protegidos de la luz. Finalmente se observaron las láminas en un microscopio *Nikon Eclipse NiE microscope* y las fotos fueron capturadas con una cámara digital fotométrica (Coolnap EZ) usando el *software NIS -Elements Advanced Research*.

7.5 Ensayos de expresión y CoIP en líquido folicular humano

7.5.1 Extracción de ARN de líquido folicular

El líquido folicular fue obtenido de una mujer donante de oocitos en tratamientos de fertilización en un centro de fertilidad en Bogotá, Colombia (cecolfes). El líquido fue almacenado en Trizol (Sigma Aldrich) a -20°C. Se realizó extracción de RNA total usando el protocolo del paso 7.2.1.1 y se realizó la síntesis del ADNc mediante el kit *SuperScript III First-Strand, Life Technologies* (Thermo fisher scientific).

7.5.2 PCR para *ADAMTS19* y *COL6A2* a partir de ADNc de líquido folicular humano.

Se usaron *primers* específicos localizados en diferentes exones, separados por intrones de >10000bp. En paralelo se realizó PCR para genes *housekeeping*.

Primers:

hADAMTS19-1273F:

5': GAGATGTCAACAACTGGGGGGAAG 3'

hADAMTS19-1639R:

5'GCGGATTTGTTTGTAGCAAGCAG 3'

Hu-COL6A2-SalI-F-Check:

5'CGCGTCGACGGAGAGAAGGGTGAATTTGGAGC 3'

hCOL6A2-1190R:

5' CTCCTGGGGCTCCACTGTTG 3'

Condiciones de la PCR:

Tabla 31. Condiciones de PCR.

Paso	Temperatura	<i>ADAMTS19</i> (Tiempo)	<i>COL6A2</i> (Tiempo)
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos	10 minutos
Desnaturalización	95°C	50 segundos	50 segundos

Anillamiento	59°C	40 segundos	40 segundos
Elongación	72°C	30 segundos	20 segundos
Elongación Final	72°C	10 minutos	10 minutos
Número de ciclos	35 ciclos		

7.5.3 Extracción de proteínas de líquido folicular

El líquido folicular fue centrifugado a 1000rpm durante 7 minutos. Se tomó 1mL del sobrenadante y se añadió 1mL de RIPA (PMSF, Ortovonadato de Sodio, coctel inhibidor de proteasas) (Santa cruz) y se mantuvo a 4°C por 15 minutos. Posteriormente, se transfirió el lisado celular a un tubo *Eppendorf* y se pasó el lisado celular 5 veces a través de una jeringa de calibre 21G. El lisado celular se mantuvo en hielo durante 40 minutos y se centrifugó a 1000g/4°C durante 20 minutos. Finalmente, se alicuotó el sobrenadante (lisado) y se almacenó a -80°C.

7.5.3.1 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el kit *BCA Protein Assay Reagent* (Pierce Biotechnology). Se obtuvieron las siguientes concentraciones:

Tabla 32. Cuantificación de extracción de proteínas de líquido folicular humano

Replica	Cuantificación de proteínas
---------	-----------------------------

1	973,107 µg/µl
2	1633 µg/µl
3	1682 µg/µl

7.5.4 Co-inmunoprecipitación del líquido folicular humano

El ensayo de co-inmunoprecipitación de líquido folicular se efectuó siguiendo el protocolo expuesto en el paso 7.3.4 y se realizó por triplicado.

7.6 Ensayos de expresión de ADAMTS19 y COL6a2 en ovario de ratón Balb/c

7.6.1 Extracción de RNA de ovario de ratón Balb/c

Los ovarios completos fueron extraídos de un ratón Balb/c hembra adulto (8 semanas). Se almacenaron en trizol (Sigma Aldrich) a -20°C. Se realizó extracción de RNA total usando el protocolo descrito en el numeral 7.2.1.1 y se realizó síntesis del ADNc mediante el kit *SuperScript III First-Strand, Life Technologies* (Thermo fisher scientific).

7.6.2 PCR de *Adamts19* y *Col6a2* a partir de ADNc de ovario de ratones Balb/c (RT-PCR)

Se usaron *primers* específicos localizados en diferentes exones, separados por intrones de >10000bp. En paralelo se realizó PCR para genes *housekeeping*.

Primers:

mAdamts19hy-F1:

5' GCTAGGTTCTGAAGCAAGGGA 3'

mAdamts19hy-R:

5' GTGCATGCTTTGGGTACGAAG 3'

mCol6A2hy-F1:

5' TTGGATCGGATGGTCGGAAG 3'

mCol6A2hy-R

5' CTCCAGGGTATCCATCGGGG 3'

Condiciones de la PCR:

Tabla 33. Condiciones de PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo <i>Adamts19</i>	Tiempo <i>Col6a2</i>
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos	10 minutos
Desnaturalización	95°C	50 segundos	50 segundos
Anillamiento	59°C	40 segundos	40 segundos
Elongación	72°C	20 segundos	20 segundos
Elongación Final	72°C	10 minutos	10 minutos
Numero de ciclos	35 ciclos		

8. Resultados

8.1 Sistema de doble híbrido en levaduras

El ensayo *ULTimate Y2H screen* identificó que las proteínas Col6a2 y Col6a1 tenían alta probabilidad de interactuar con la región *bait* de Adamts19 (15 de 145 clones de secuencias positivas, mostraron secuencias de Col6a2 ó Col6a1). Estas proteínas tuvieron un Puntaje Biológico Predicho (PBS) en categorías A y B, respectivamente (tabla 34).

Tabla 34. Resultados de *PBS ULTimate Y2H SCREEN Mus musculus - Adamts19 vs Mouse Ovaries_RP1*.

Id del Clon	Tipo de Secuencia	Nombre del Gen	Inicio-parada (nt)	Marco de lectura	PBS
pB66_A-17	5p/3p	Mus musculus - Col6a1	990..2011	IF	B
pB66_B-87	5p/3p	Mus musculus - Col6a1	1217..2131	OOF2	B
pB66_B-114	5p/3p	Mus musculus - Col6a1	1524..2042	IF	B
pB66_A-1	5p/3p	Mus musculus - Col6a1	1587..2038	IF	B
pB66_A-28	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	963..1992	IF	A
pB66_A-16	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1053..2008	IF	A
pB66_A-39	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1206..1981	IF	A
pB66_A-23	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1236..1970	IF	A
pB66_A-15	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1284..1992	IF	A
pB66_A-32	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1329..2169	IF	A
pB66_B-26	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1338..2010	IF	A
pB66_B-40	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1338..2010	IF	A
pB66_B-70	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1452..1991	IF	A
pB66_B-28	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1524..2014	IF	A
pB66_A-33	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1698..1992	IF	A

Otros 130 clones positivos fueron secuenciados, y se identificaron 14 péptidos candidatos clasificados en las categorías de la C a la F, pero representaban proteínas que no estaban claramente caracterizadas y/o se predijo que correspondían a fragmentos truncados cortos. Los alineamientos de secuencias y el análisis bioinformático de los clones positivos revelaron un dominio de interacción de Col6a2 (SID) que abarca los residuos Gly⁵⁶⁷ a Val⁶⁵⁶. El SID para Col6a1 comprendió los aminoácidos Arg⁵³⁰ a Gln⁶⁷⁰.

8.2 Sistema de doble híbrido en células eucariotas - *CheckMate™ Mammalian*

***Two-Hybrid System* con secuencias humanas.**

Los resultados del sistema de doble híbrido en células eucariotas *CheckMate Mammalian Two-Hybrid System* (Promega) fueron evaluados de acuerdo a la cuantificación de las unidades relativas de luciferasa (URL), e indicaron que no se produjo la interacción entre las regiones proteicas traducidas a partir de las construcciones transfectadas (Figura 19).

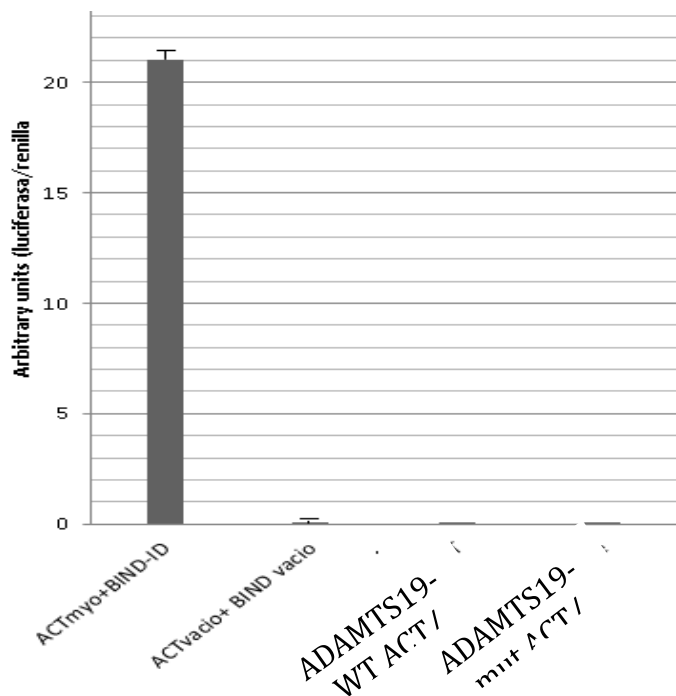


Figura 19. Resultados expresados en URL (unidades relativas de luciferasa) del ensayo doble híbrido en eucariotas.

A partir de este resultado, en el cual no fue posible establecer la unión entre ADAMTS19 y COL6A2, se determinó si estos fragmentos proteicos estaban presentes en las células luego de su co-transfección, mediante WB e IFI (Figura 20, 21 y 22).

8.2.1 Western blot de co-transfección de los plásmidos codificantes de los fragmentos proteicos de ADAMTS19 y COL6A2

A continuación, se presentan los resultados del Western blot realizado para la verificación de la traducción de las proteínas fusión, pACT-ADAMTS19WT, pACT-ADAMTS19Mut y

pBIND-COL6A2. Las construcciones plasmídicas transfectadas en células CHO, corresponden a las usadas en el experimento de *CheckMate*.



Figura 20. WB de verificación del CM. A. Proteína fusión pBIND-COL6A2 (39.7k Da). B. Proteína fusión pACT-ADAMTS19WT (75 kDa). C. Proteína fusión pACT-ADAMTS19Mut (75 kDa).

Los resultados del WB indican que se llevó a cabo la traducción de las proteínas luego de la transfección en células CHO a partir de las construcciones pACT-*ADAMTS19WT*, pACT-*ADAMTS19Mut* y pBIND-*COL6A2*. El peso molecular de cada una de las proteínas identificadas correspondió al esperado. Para *COL6A2* fue de 39.7 kDa y para *ADAMTS19* de 75 kDa. Fue utilizado como control positivo, la β -actina (*house keeping*). Esta verificación indica que las construcciones plasmídicas utilizadas en el sistema de doble híbrido en células eucariotas *CheckMate Mammalian Two-Hybrid*, producen las proteínas esperadas.

Las células CHO no transfectadas no expresan de manera basal las proteínas *ADAMTS19* y *COL6A2*. Esta afirmación es consecuente con los resultados de los ensayos previos realizados de RT-PCR 7.2.6. En RT-PCR no se evidenció la amplificación de *ADAMTS19* ni de *COL6A2* a partir de ADNc obtenido del RNA de las células no transfectadas (Figura 26).

El extracto proteico utilizado para WB no indicó la presencia de las proteínas ADAMTS19 y COL6A2.

8.2.2 Resultados de inmunofluorescencia indirecta

A continuación, se presentan los resultados de la inmunofluorescencia indirecta realizada para la verificación de la producción y la potencial colocalización de las proteínas fusión post-transfección de las construcciones pACT-ADAMTS19WT, pACT-ADAMTS19Mut y pBIND-COL6A2 usadas en el experimento de CM.

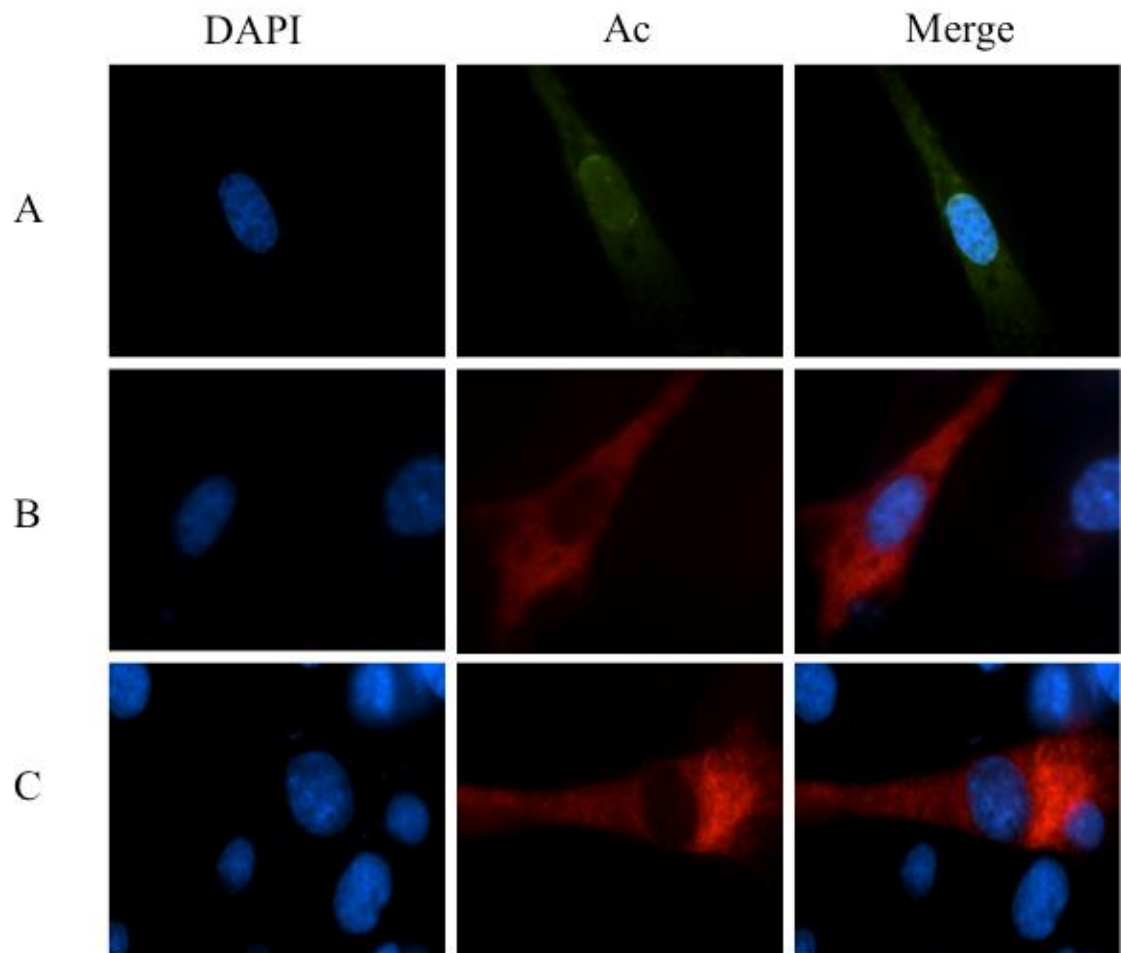


Figura 21. Resultados de la inmunofluorescencia indirecta, post transfección individual de las construcciones del CM en células CHO. A) pBIND-COL6A2, B) pACT-ADAMTS19WT y C) pACT-ADAMTS19Mut. Se aprecia en cada imagen DAPI, Ac ADAMTS19 (Texas Red), Ac COL6A2 (Fluoresceína) y *merge*. Fotos capturadas con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse NiE 100X.

Los resultados de la inmunofluorescencia indirecta presentados en la Figura 22, indican que se realizó la traducción de las proteínas luego de la transfección en células CHO de las construcciones pACT-ADAMTS19WT, pACT-ADAMTS19Mut y pBIND-COL6A2. Se

evidencia que la localización de las dos proteínas es citoplasmática, con distribución homogénea. No se observó diferencia entre las proteínas ADAMTS19 WT y mutantes. Esta verificación es coherente con los resultados obtenidos con el WB (descrito en la sección anterior) e indica que las construcciones plasmídicas utilizadas en el sistema de doble híbrido en células eucariotas *CheckMate Mammalian Two-Hybrid*, producen las proteínas esperadas.

A continuación, se presentan los resultados de la inmunofluorescencia indirecta realizada para el estudio de la potencial colocalización de las proteínas luego de la transfección de las construcciones pACT-ADAMTS19WT ó pACT-ADAMTS19Mut y pBIND-COL6A2.

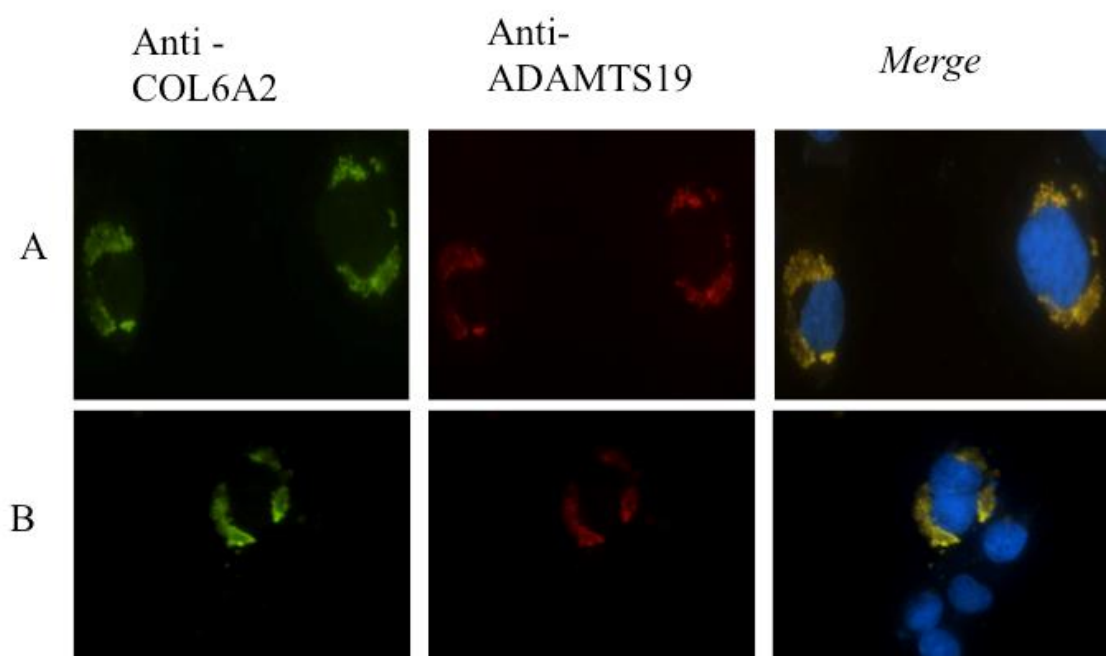


Figura 22. COL6A2 se colocaliza y forma agregados citoplasmáticos con ADAMTS19 WT y con ADAMTS19 mutante en células CHO co-transfectadas con las construcciones plasmídicas de CM. **A.** pBIND-COL6A2 y pACT-ADAMTS19WT y **B.** pBIND-COL6A2 y

pACT-ADAMTS19 mut. Fotos obtenidas con microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse NiE. 100X.

Los resultados de la inmunofluorescencia indirecta presentados en la figura 22, indican que se produjo la traducción de las proteínas luego de la co-transfección en células CHO de las construcciones pACT-ADAMTS19WT o pACT-ADAMTS19Mut con pBIND-COL6A2. Se observa la colocalización de las dos proteínas. Sin embargo, se producen imágenes similares a las de agregados citoplasmáticos lo que implica una clara diferencia con la distribución homogénea de las proteínas luego de transfectarse de manera individual (Figura 21). Con este hallazgo es posible hipotetizar que las proteínas producidas tienden a agregarse lo que eventualmente podría afectar su adecuada interacción. Esto podría explicar los resultados negativos del experimento del sistema de doble híbrido en células eucariotas *CheckMate Mammalian Two-Hybrid*.

8.3 Co-inmunoprecipitación post-transfección

La unión entre ADAMTS19 y COL6A2 fue confirmada por medio de los ensayos de CoIp en células CHO post-transfección (Figura 23). También se evidenció interacción de la versión ADAMTS19mut (p.Thr943Ile) y COL6A2 indicando que la mutación no afecta la interacción de ADAMTS19 y COL6A2. Esta interacción no había sido previamente reportada, ya que hasta la fecha la proteína ADAMTS19 había sido considerada como huérfana.

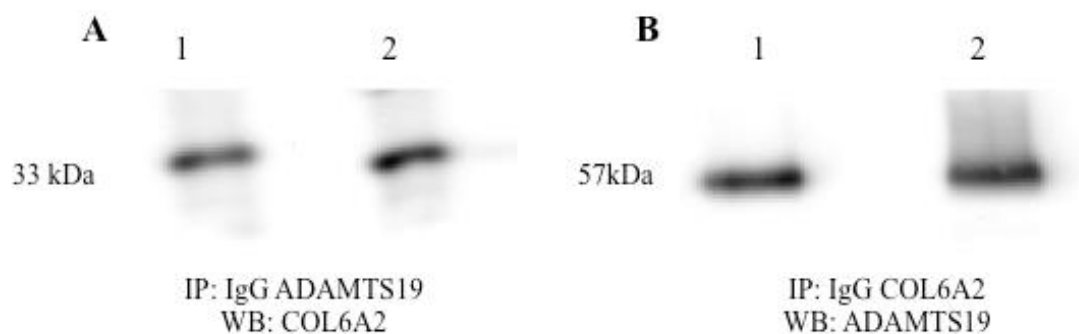


Figura 23. COL6A2 interactúa con ADAMTS19 WT (carriles 1) y (mut carriles 2) en células CHO transfectadas. A) Extractos proteicos inmunoprecipitados con anti-ADAMTS19 y detectados en WB con anti-COL6A2. B) Extractos proteicos inmunoprecipitados con anti-COL6A2 y detectados en WB con anti-ADAMTS19.

Las regiones de interacción identificadas corresponden a Gly⁵⁶⁷-Val⁶⁵⁶ de COL6A2 que comprende gran parte del dominio triple hélice y una parte del dominio globular C-terminal y a His⁶³⁴-Trp¹¹⁶⁹ de ADAMTS19 que comprende parte del dominio desintegrina, el dominio rico en cisteína, la región espaciadora, los dominios TSR y parte del dominio PLAC (Figura 24).

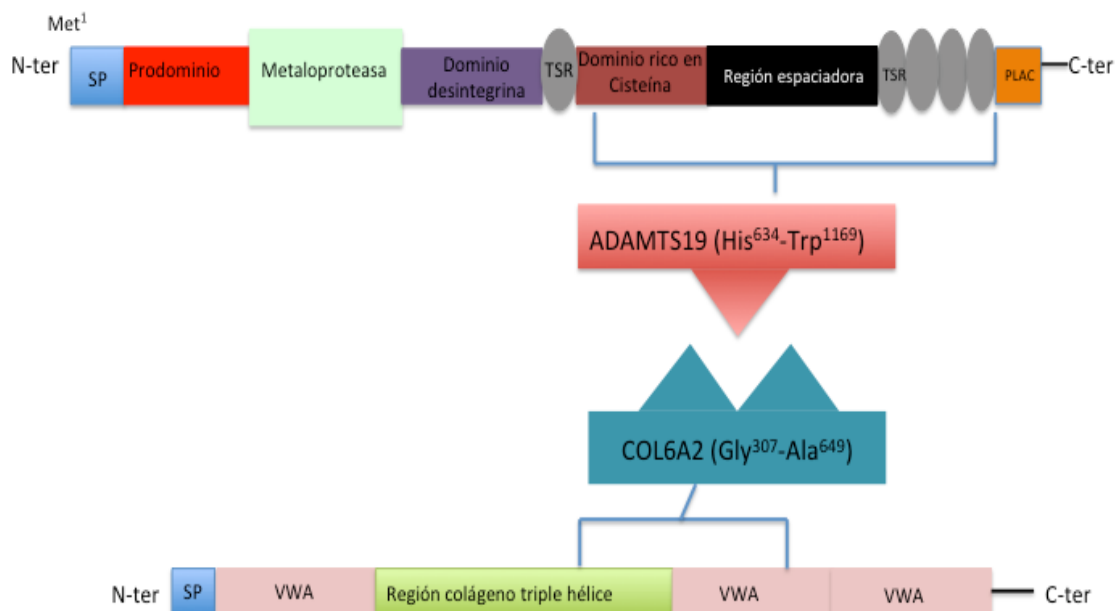


Figura 24. Ilustración esquemática de la interacción entre ADAMTS19 y COL6A2. SP: péptido señal; TSR: Repeticiones de trombospondina; PLAC: dominio proteasa-lacunina; VWA: Dominio *Von Willebrand* tipo A.

8.3.1 Inmunofluorescencia indirecta de ADAMTS19WT y ADAMTS19Mut con COL6A2 en células CHO

A continuación, se presentan los resultados de la inmunofluorescencia indirecta de las proteínas ADAMTS19WT, ADAMTS19Mut y COL6A2. El experimento se realizó luego de la co-transfección de los plásmidos *ADAMTS19*-WT-pCDNA3.0, *ADAMTS19*-T943I-pCDNA3.0 y *COL6A2*-pCDNA3.0 en células CHO.

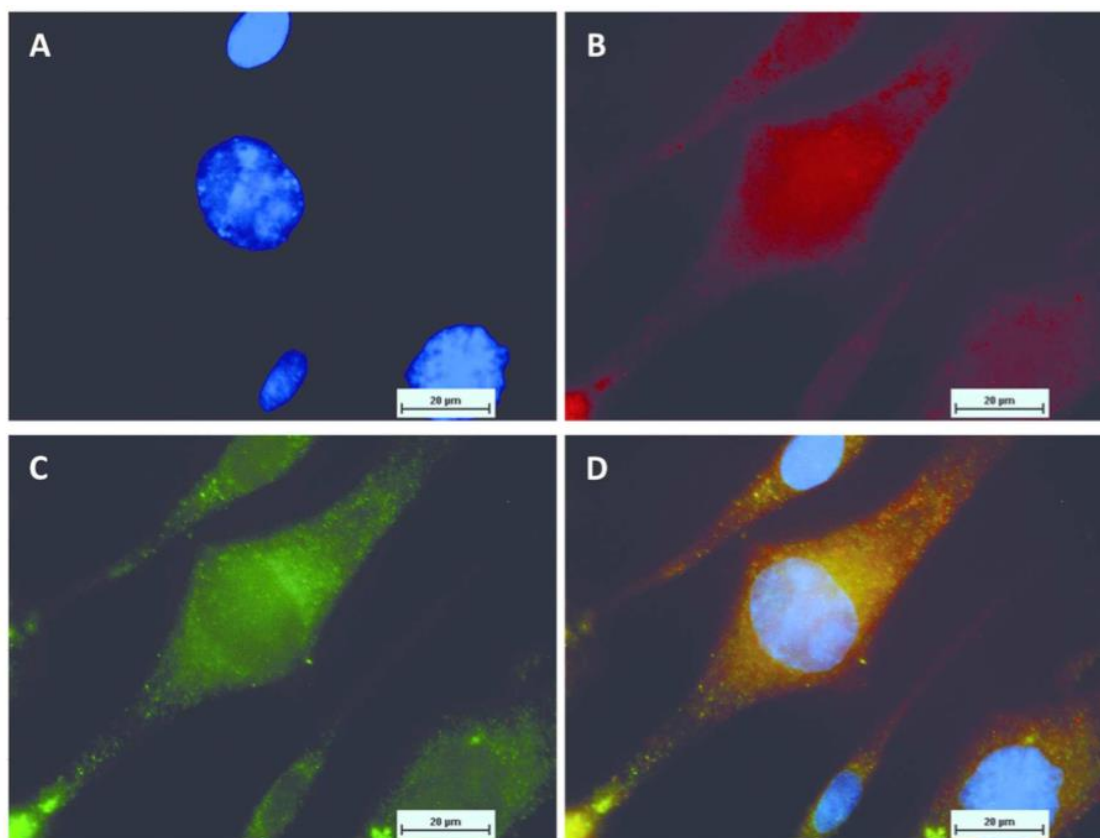


Figura 25. Co-localización de ADAMTS19 y COL6A2 en células CHO transfectadas. A) DAPI. B) Anticuerpo COL6A2. C) Anticuerpo ADAMTS19 y D) Merge. Fotos con Microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse NiE. Aumento 100X.

Los experimentos de inmunofluorescencia indirecta indicaron colocación de los fragmentos de proteínas generados a partir de las construcciones plasmídicas co-transfectadas *ADAMTS19*-WT-pCDNA3.0, *ADAMTS19*-T943I-pCDNA3.0 con *COL6A2*-pCDNA3.0. La distribución fue citoplasmática con un patrón uniforme. Los resultados no indicaron diferencias entre los fragmentos de proteínas generadas de las construcciones *ADAMTS19*-WT-pCDNA3.0 y *ADAMTS19*-mut-pCDNA3.0.

8.4 Ensayos de co-expresión de ADAMTS19 y COL6A2

A continuación, se describen los resultados de los ensayos de co-expresión de ADAMTS19 y COL6A2 analizados en células CHO post-transfección (CoIp), en ovarios de ratón (Adamts19 y Col6a2) y en líquido folicular humano.

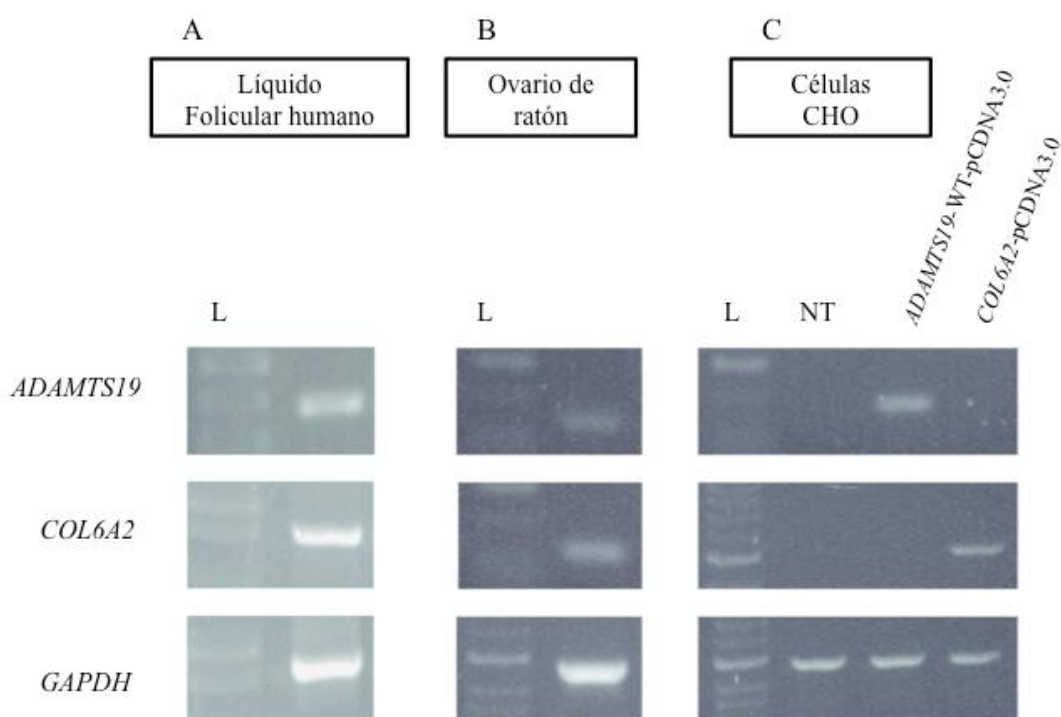


Figura 26. Expresión de ADAMTS19 y COL6A2. Se realizó RT-PCR con primers específicos en ADNc a partir de RNA total aislado de A) Líquido folicular humano, B) Ovarios de ratón y C) Células CHO transfectadas con las construcciones ADAMTS19-WT-pCDNA3.0 o COL6A2-pCDNA3.0. *GAPGH*: gen *housekeeping*; L: *ladder*; NT: Células CHO no transfectadas.

No se encontró expresión de ADAMTS19 y COL6A2 en células CHO no transfectadas lo que se correlaciona con ensayos de IFI y WB en células no transfectadas. Se identificó co-expresión de *ADAMTS19* y *COL6A2* en líquido folicular humano. De la misma forma los genes son coexpresados en ovarios de ratón Balb/c.

8.4.1 Western blot de líquido folicular humano

A continuación, se presentan los resultados del WB realizado a partir de extractos proteicos obtenidos de líquido folicular humano.



Figura 27. Western blot. Extracto de proteínas totales de líquido folicular humano. A. ADAMTS19 (126 kDa). B. COL6A2 (133 kDa).

Los resultados obtenidos indicaron que las proteínas ADAMTS19 y COL6A2 se expresaban en muestras de líquido folicular humano. Este hallazgo no había sido documentado previamente.

8.5 Co-inmunoprecipitación a partir de líquido folicular humano

A continuación, se presentan los resultados de la co-inmunoprecipitación entre ADAMTS19 y COL6A2 realizada a partir de extractos proteicos obtenidos de líquido folicular humano.

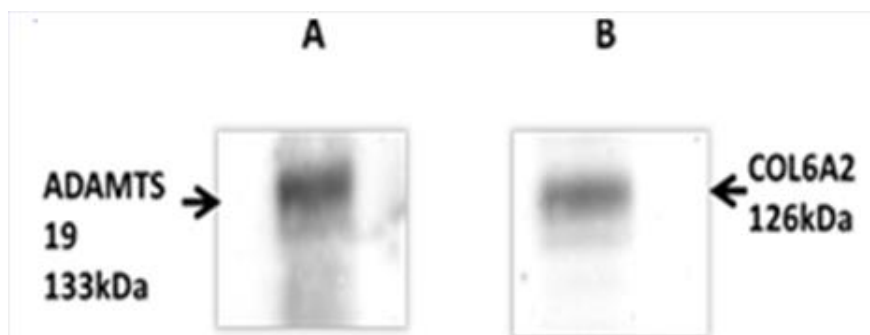


Figura 28. Co-inmunoprecipitación de ADAMTS19 y COL6A2 en una muestra de líquido folicular humano. A) Extractos proteicos inmunoprecipitados con anti-COL6A2 y detectados en WB con anti-ADAMTS19. B) Extractos proteicos inmunoprecipitados con anti-ADAMTS19 y detectados en WB con anti-COL6A2.

Los resultados obtenidos de la co-inmunoprecipitación de ADAMTS19 y COL6A2 indicaron que, en un contexto ovárico como el líquido folicular, estas dos proteínas interaccionan.

9. Discusión y perspectivas

La proteína ADAMTS19 ha sido incluida en el grupo de metaloproteinasas “huérfanas”, denominadas de esta forma debido a que no se conocen sus sustratos específicos (Porter et al., 2005; Russell et al., 2014; Kelwick et al., 2015). En este trabajo se identificó por primera vez la interacción proteína: proteína entre COL6A2 y ADAMTS19. Este hallazgo fue respaldado por la coexpresión de las dos proteínas en líquido folicular humano y en ovario de ratón Balb/c.

Se utilizó el sistema doble híbrido como método de *screening* para identificar proteínas que interactuaran con Adamts19. Este sistema ha sido empleado previamente para la identificación de *partners* de otras metaloproteinasas como ADAMTS-7 y ADAMTS-12 (Guo et al., 2010). La alta especificidad de esta técnica permitió tamizar aproximadamente 83 millones de interacciones, y más de 380 clones. De acuerdo a servicios especializados de la empresa *Hybrigenics* cabe anotar que este tamizaje es uno de los más robustos del mercado, por la cantidad de interacciones evaluadas. Esta metodología fue realizada a partir de una librería de ADNc de ovario de *Mus Musculus* debido a la disposición de librerías de ADNc de este tejido en *Hybrigenics* y a que la expresión de *Adamts19* en ovarios de ratones hembra (XX) ha sido demostrada (desde el día E12.5) (Menke y Page, 2002; Bouma et al., 2004; Knauff et al., 2009a).

Evaluamos si la interacción con COL6A2 se mantenía en proteínas humana teniendo en cuenta la alta homología (87%) entre las secuencias de Adamts19 (murino) y ADAMTS19 (humano). Sin embargo, no fue posible comprobar la interacción de las proteínas humanas

mediante el sistema *CheckMate*TM (CM), probablemente debido a que las proteínas fusión generaban estructuras similares a agregados proteicos condensados perinucleares observados en los ensayos de IFI (Figura 22). Es posible que estos agregados no permitieron que se produjera una señal de activación específica para la interacción de las proteínas debido posiblemente a un inadecuado plegamiento proteico o a una incorrecta distribución subcelular de las proteínas de interés. Es posible además que las proteínas fusión fueran retenidas en el retículo endoplásmico puesto que se observaron agregados a nivel perinuclear.

El hallazgo descrito en este trabajo de la co-expresión e interacción proteína: proteína de ADAMTS19 y COL6A2 en una muestra de líquido folicular humano puede ser un indicativo de su función en este contexto. La formación del líquido folicular probablemente requiere de un proceso activo de remodelamiento celular, que permita el transporte de fluidos dentro del folículo. En este contexto, es posible hipotetizar que la acción proteolítica de proteínas como ADAMTS19 puede ser determinante. Además, es posible que durante el crecimiento folicular ADAMTS19 ejerza su actividad enzimática sobre las microfibras de COL6A2, participando en la expansión de la lámina basal y en la proliferación de las células de la granulosa. (Yurchenco y Schittny, 1990; Weber. et al., 1992; Zhao y Luck, 1995; Timpl y Brown, 1996; Rodgers et al., 2000, 2003b). Además, puesto que el SID de COL6A2 incluye un dominio VWA considerado fundamental para la unión, el reconocimiento y el clivaje por otras proteínas como las fibronectinas y otras ADAMTS (ADAMTS13) es coherente suponer que ADAMTS19 contribuya a la degradación de colágenos tipo VI en la remodelación de la matriz extracelular. Suponemos que dicha acción proteasa conlleva a la

degradación de COL6A2 y a la expansión celular para el crecimiento folicular (Soejima et al., 2003).

Es importante resaltar que la muestra de líquido folicular correspondía a una paciente donadora de óvulos para procesos de fertilización *in vitro* que fue sometida a estimulación hormonal (FSH recombinante), lo cual podría alterar la expresión proteica del líquido folicular. Además, debido a la dificultad para la obtención de muestras de ovario para la realización de ensayos adicionales, se recomienda utilizar un modelo murino (*knock in condicional*) para acceder al tejido ovárico y al líquido folicular con el objetivo de evaluar la interacción proteica en ausencia de estímulos hormonales inducidos artificialmente.

En el presente trabajo evaluamos si la mutación ADAMTS-p.Thr943Ile descrita por Fonseca y colaboradores en una paciente con FOP afectaba la interacción de ADAMTS19 con COL6A2 (Fonseca et al., 2015). La mutación p.Thr943Ile se encuentra localizada en la primera repetición de trombospondina en la región C-terminal de la proteína la cual es necesaria para la especificidad del sustrato y la localización subcelular (Porter et al., 2005). A pesar de que los ensayos de CoIp no evidenciaron efectos funcionales de la mutación p.Thr943Ile sobre la interacción ADAMTS19/COL6A2, no descartamos su posible efecto patogénico en la FOP teniendo en cuenta que esta patología es de origen poligénico por lo que efectos aditivos mínimos pueden contribuir al fenotipo (Conway, 2000; Toniolo, 2006; Laissue et al., 2008; Persani et al., 2010; Laissue, 2015). Adicionalmente, es posible pensar que la mutación pueda alterar parcialmente la unión proteína: proteína y que estos cambios parciales no pudieron ser evidenciados por una técnica cualitativa como la empleada (CoIp). Sugerimos entonces el desarrollo de técnicas que evalúen la interacción proteína: proteína de

forma cuantitativa, como la medición de la constante de disociación de la interacción proteica, donde una proteína es inmovilizada mediante anticuerpos y la otra se encuentra en solución. Con la finalidad de determinar la concentración de la proteína libre (Nelson y Long, 1991). De tal manera esta técnica permitiría evaluar cuantitativamente la interacción entre COL6A2 y ADAMTS19 y comparar la tasa de disociación entre las versiones de ADAMTS19/WT y p.Thr943Ile.

Otra técnica, la cristalografía de rayos X, permitiría visualizar la estructura de ADAMTS19 lo cual evidenciaría los posibles cambios conformacionales generados por la mutación p.Thr943Ile y sus efectos estructurales en la interacción con COL6A2. Además, se sugiere la modelación modelaje bioinformática de la proteína ADAMTS19 p.Thr943Ile por medio del cual se podrían hacer predicciones computacionales de los posibles cambios estructurales y moleculares generados por la mutación (Connell et al., 2009). También se recomienda evaluar si la mutación puede generar algún efecto en la actividad catalítica de la enzima ADAMTS19.

Finalmente, en el grupo CIGGUR disponemos del modelo *knockout* para *Adamts19* y cuya información específica es de carácter confidencial, pero podría arrojar nuevos resultados sobre la implicación de *Adamts19* en la función ovárica.

10. ANEXO 1

Artículo sometido: **Identifying protein interaction partners in the ovary for the orphan ADAMTS19 metalloproteinase**

Fonseca Dora; Fetiva Camila; Pannetier Maelle; André Marjolaine; Bello Sandra; Buitrago July; Esteban-Perez Clara; Moreno-Ortiz Harold; Lucena Elkin; Castro Andrés; Nieto José; Pailhoux Eric; Laissue Paul.

Revista: Reproduction. Enero 19 de 2017



Reproduction



Identifying protein interaction partners in the ovary for the orphan ADAMTS19 metalloproteinase

Journal:	<i>Reproduction</i>
Manuscript ID:	REP-17-0038
mstype:	Research paper
Date Submitted by the Author:	19-Jan-2017
Complete List of Authors:	Fonseca, Dora; Universidad del Rosario, Centro de Investigación en Genética y Genómica-CIGGUR Fetiva, Camila; Universidad Del Rosario, Genetics Pannetier, Maelle; INRA, UMR 1198 André, Marjolaine; INRA Centre de Jouy-en-Josas, Ile de France Bello, Sandra; Universidad Del Rosario, CIGGUR Buitrago, Joly; Universidad Del Rosario, CIGGUR Esteban-Perez, Clara; Centro Colombiano de Esterilidad y Fertilidad Ltda, Genetics Moreno-Ortiz, Harold; Centro Colombiano de Esterilidad y Fertilidad Ltda, Genetics Lucena, Elkin; Centro Colombiano de Esterilidad y Fertilidad Ltda, Genetics Castro, Andrés; Fundacion Universitaria de Ciencias de la Salud, Pathology Polo-Nieto, José; Fundacion Universitaria de Ciencias de la Salud, Pathology Pailhoux, Eric; INRA Centre de Jouy-en-Josas, Genetics Laissue, Paul; Universidad del Rosario, Centro de Investigación en Genética y Genómica-CIGGUR
Keywords:	ADAMTS19, COL6A2, BASAL LAMINA, FOLLICLE DEVELOPMENT

SCHOLARONE™
Manuscripts

**Identifying protein interaction partners in the ovary for the orphan
ADAMTS19 metalloproteinase**

Dora J. Fonseca¹, Camila Fetiva¹, Maëlle Pannetier², Marjolaine André², Sandra Bello¹,
Judy C. Buitrago¹, Clara Esteban-Perez³, Harold Moreno-Ortiz³, Elkin Lucena³, Andrés
Castro⁴, José F. Polo-Nieto⁴, Eric Pailhoux² and Paul Laissue¹

¹ Centro de Investigación en Genética y Genómica-CIGGUR. Grupo GENIUIROS. Escuela
de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad del Rosario. Bogotá, Colombia.

² UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, Jouy en Josas, France

³ Department of Reproductive Genetics. Fertility and Sterility Colombian Center. Bogotá,
Colombia.

⁴ Grupo de Patología. Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud. Bogotá, Colombia.

Corresponding author: Prof. Paul Laissue

Centro de Investigación en Genética y Genómica-CIGGUR. Grupo GENIUIROS. Escuela
de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad del Rosario. Bogotá, Colombia.

Address: Carrera 24 N° 63C-69, Bogotá, Colombia

Tel : +57 1 3474570

Fax : +57 1 3474570

email: paul.laissue@urosario.edu

Short title: New protein partners of ADAMTS19 in the ovary

24 Abstract

25 ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) enzymes have
26 been linked to numerous biological processes, including fertility. Substrates have not yet
27 been described for some of them (e.g. ADAMTS18 and ADAMTS19). ADAMTS19 is of
28 particular interest during female reproduction since its expression has been observed in
29 mouse XX gonads during distinct developmental stages and because potentially pathogenic
30 *ADAMTS19* sequence variants have been identified in women affected by primary ovarian
31 insufficiency (POI).

32 In the present study we used yeast two-hybrid (Y2H) experiments to screen potential
33 ADAMTS19 partners. We identified that ADAMTS19 directly binds to collagen type VI,
34 alpha 2 chain (COL6A2). Coimmunoprecipitation assays were performed, in transfected
35 cells and human follicular fluid, to confirm ADAMTS19/COL6A2 direct interaction. RT-
36 PCR corroborated *Adamts19/Col6a2* coexpression. Indirect immunofluorescence was
37 carried out to assess proteins' localization. We found that these proteins colocalize in
38 specific structures of the ovary displaying important role in reproduction.

39 We propose that ADAMTS19 enzymatic activity on COL6A2 microfibers in growing
40 follicles participates in the normal expansion of the basal lamina, thereby permitting
41 granulosa cell proliferation. ADAMTS19 might act as an important molecule during follicle
42 development contributing to create physiological conditions for granulosa cells maturation
43 and growth. Although functional testing of the p.Thr943Ile ADAMTS19 mutation
44 (previously identified in a POI patient) did not reveal ADAMTS19/COL6A2 protein
45 interaction disturbances, we cannot discard it as contributing to the disease's aetiology.

46 Our results enabled the first protein partner for ADAMTS19 to be described and a new
47 potential role during female fertility to be proposed.

48 Introduction

49

50 Extracellular matrix (ECM) is a biological component between and around cells conferring
51 specific biochemical, biophysical and functional properties on tissues (Yue, 2014). The
52 intricate ECM network consists of hundreds of factors (e.g. fibrillary proteins,
53 glycoproteins, proteoglycans) participating in structural and mechanical tissue support,
54 tissue differentiation, cell adhesion and motility, as well as basement membrane-mediated
55 sculpting of tissue features (Daley and Yamada, 2013). ECM requires remodelling and
56 turnover; its molecules are thereby constantly synthesised, modified, deposited and degraded
57 in a fine regulated dynamic fashion. For remodelling (which can be defined as the
58 breakdown and clearance of the ECM) most important enzymes are metalloproteinases,
59 particularly matrix metalloproteinases (MMP), ADAM (A Disintegrin And
60 Metalloproteinase) proteins and metalloproteinases having thrombospondin motifs
61 (ADAMTS) (Apte and Parks, 2015; Cawston and Young, 2010). ADAMTS, the most
62 recently discovered group, consists of at least 19 members encoded by genes located
63 throughout (not clustered) human and mouse genomes (Dubail and Apte, 2015). ADAMTS
64 proteins globally consist of an N-terminal protease domain (containing the catalytic
65 activity) and C-terminal ancillary domains (usually providing substrate-binding specificity).
66 Although some variability has been observed amongst ADAMTS members, these proteins
67 have distinct regions (located from N- to C-terminal): a signal peptide, a prodomain, a
68 metalloproteinase catalytic domain, a disintegrin-like domain, a central thrombospondin
69 type I-like (TS) domain, a 10 conserved cysteine residue-rich domain, a spacer region and a
70 second TS module containing different numbers of repeats (Cal *et al.*, 2002; Porter *et al.*,
71 2005). Further protein regions have been described in some members of the family, such as

3

reproduction@bioscientifica.com

72 protease and lacunin (PLAC), mucin-like (MUC), GON-1 and CUB domains (Porter *et al.*,
73 2005). After synthesis, N-terminal processing (e.g. signal peptide and pro-domain removal
74 by peptidases) is important for establishing normal ADAMTS proteins' distribution/release
75 and bioactivity. Further post-translational modifications include N-glycosylation, C-
76 mannosylation and O-fucosylation (Kelwick *et al.*, 2015) (and references therein).
77 Depending on their domain organisation and known functions, ADAMTS proteins can be
78 included in distinct subgroups (or "clades"): aggreganase, proteoglycanase, pro-collagen
79 N-propeptidase, cleaving cartilage oligomeric matrix protein and the von-Willebrand factor
80 (vWF)-cleaving protease (ADAMT13 being the sole member of the vWF clade). Three
81 further subgroups have been proposed, collectively named "orphan", for which protein
82 partners (substrates) have not been identified (Kelwick *et al.*, 2015).

83 Among this family, ADAMTS19 is of particular interest during female reproduction since
84 its expression has been observed in mouse XX gonads during distinct developmental stages
85 and because potentially pathogenic *ADAMTS19* sequence variants have been identified in
86 women affected by primary ovarian insufficiency (POI) (Bouma *et al.*, 2004; Fonseca *et al.*,
87 2015; Knauff *et al.*, 2009; McClelland *et al.*, 2015; Menke and Page, 2002; Pyun *et al.*,
88 2013, 2015).

89 Using yeast two-hybrid (Y2H) screening and coimmunoprecipitation assays, the present
90 study identified that ADAMTS19 binds to collagen, type VI, alpha 2 (COL6A2). These
91 findings have been confirmed by positive colocalization experiments involving transfected
92 cells as well as human ovarian tissue.

93 Taken together, our results enabled the first protein partner for ADAMTS19 to be described
94 and a new potential role during female fertility to be proposed. Although functional testing
95 of the p.Thr943Ile ADAMTS19 mutation (previously identified in a POI patient) did not

96 reveal ADAMTS19/COL6A2 protein interaction disturbances, we cannot completely
97 discard it as contributing to the disease's aetiology.

98

99 **Materials and Methods**

100

101 *Y2H screening*

102 A mouse Adamts19 fragment (amino acids 637-1172 at protein level, Uniprot accession
103 number: P59509) was used for Y2H screening (Supplementary Figure S1). The
104 corresponding cDNA region was PCR-amplified and cloned into the pB27 plasmid as a C-
105 terminal fusion to Nter-LexA-Adamts19-Cter (LexA) and into the pB66 plasmid as a C-
106 terminal fusion to the Gal4 DNA-binding domain (Nter-Gal4-Adamts19-Cter). Sequences
107 were checked by direct sequencing. The Adamts19 region tested in Y2H assays (bait),
108 which is highly conserved between human and mouse species, involved (from C-term to N-
109 term) the central TS domain, the cysteine-rich domain, the spacer region and the complete
110 second TS module. Previous studies have shown that in several ADAMTS factors,
111 including procollagen N-propeptidases, these regions participate in substrate recognition
112 and binding (Colige *et al.*, 2005; Fontanil *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2010; Kuno and
113 Matsushima, 1998; Lee *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006).

114 Plasmids were used as bait to screen a random-primed adult mouse ovary cDNA library
115 constructed into pP6 plasmid. pB27 and pB66 and pP6 were derived from pBTM116
116 pAS2ΔΔ and pGADGH plasmids, respectively. The LexA bait construct required 90
117 million clones (9-fold the complexity of the library) to be screened using a mating approach
118 with YHGX13 (Y187 ade2-101::loxP-kanMX-loxP, mata) and L40ΔGal4 (mata) yeast
119 strains, as previously described (Fromont-Racine *et al.*, 1997). A total of 11 His⁺ colonies

5

reproduction@bioscientifica.com

120 were selected on a medium lacking tryptophan, leucine and histidine. For the Gal4
121 construct, 15 and 42 million clones (1.5-fold and 4-fold the complexity of the library) were
122 screened using the same mating approach with YHGX13 (Y187 *ade2-101::loxP-kanMX-*
123 *loxP*, *mata*) and CG1945 (*mata*) yeast strains. A total of 34 and 100 His⁺ colonies were
124 selected on a medium lacking tryptophan, leucine and histidine. Positive clones' prey
125 fragments were amplified by PCR and sequenced at their 5' and 3' junctions. The resulting
126 sequences were used for identifying the corresponding interacting proteins from the
127 GenBank database (NCBI). A predicted biological score (PBS or confidence score) was
128 attributed to each interaction, as previously described (Formstecher, 2005). Briefly, PBS
129 relies on two different levels of analysis. Firstly, a local score takes prey fragment
130 redundancy and independence into account, as well as reading frame and stop codon
131 distribution in overlapping fragments. Secondly, an overall score considers the interactions
132 found in all screening previously performed with the same library. This overall score
133 represents the probability of an interaction being nonspecific. For practical use, the scores
134 were divided into four categories, from A (highest confidence) to D (lowest confidence).
135 Two further categories (E and F) have been established but represent low probability of
136 interactions and imply numerous technical artefacts. PBS scores have been shown to
137 positively correlate with interactions' biological significance (Rain *et al.*, 2001; Wojcik *et*
138 *al.*, 2002). Y2H screening was performed by Hybrigenics Services, S.A.S., Paris, France
139 (<http://www.hybrigenics-services.com>).

140

141 *In silico comparative analysis of sequences*

142 The following sequences were used for multiple protein sequence alignments (Clustal
143 Omega software) between human and mouse species: ADAMTS19 (Uniprot accession

6

reproduction@bioscientifica.com

number: (Q8TE59), Adamts19 (P59509), COL6A2 (P12110), Col6a2 (Q02788), COL6A1 (P12109), Col6a1 (Q04857).

Plasmids and constructs

Since mouse Col6a2 SID regions were found to have been highly conserved during evolution, we decided to validate, via coimmunoprecipitation, ADAMTS19/COL6A2 interaction by using human sequences (Supplementary Figure S1).

The complete wild type (WT) coding region of human *ADAMTS19* (NM_133638), cloned into the pCMV6-AC-GFP plasmid, was purchased from Origene Inc (RG213075 product). Using this plasmid a human *ADAMTS19* fragment including c.1900 to c.3507 (residues His⁶³⁴ to Trp¹¹⁶⁹ Uniprot accession number Q8TE59) was amplified by PCR (GoTaq Long PCR Master Mix-Promega). The *COL6A2* wild type region (NM_001849) encompassing c.919 to c.1947 (residues Gly³⁰⁷ to Ala⁶⁴⁹ Uniprot accession number P12110) was amplified by PCR from previously extracted/synthesised normal skin RNA/cDNA (Ortega-Recalde *et al.*, 2015) (Supplementary Figure S1 and S2). To note, the COL6A2 fragment which was used for these experiments (as well as for colocalization studies) have included 245 residues (wild type sequence) located at the N-terminal end of the predicted SID region. Eight amino acids were also incorporated at the SID C-terminal domain (Supplementary Figure S2). These residues should, theoretically, have conferred structural stability to the tested fragment.

ADAMTS19 and COL6A2 amplicons were cloned into the pCR4-TOPO-TA plasmid (Life Technologies, Foster City, CA, USA) and directly sequenced for discarding constructs having unexpected mutations induced by Taq polymerase. ADAMTS19 and COL6A2 fragments were thereafter cloned into expression vector pCDNA3.0 (named: ADAMTS19-

7

reproduction@bioscientifica.com

168 WT-pCDNA3.0 and COL6A2-pCDNA3.0, respectively) using standard digestion/ligation
169 procedure. Overlapping fusion-PCR was carried out for creating the ADAMTS19 mutant
170 version, including the p.Thr943Ile mutation (ADAMTS19-T943I-pCDNA3.0 construct).
171 Identical sub-cloning and cloning strategies to those described above were performed for
172 introducing the mutant version into the pCDNA3.0 plasmid.

173

174 *RNA extraction, cDNA synthesis and RT-PCR*

175 CHO cultured cells were trypsinised and stored for total RNA extraction. Complete ovaries
176 were dissected from adult (8 weeks of age) Balb/c mice and stored in Trizol (Life
177 Technologies) reagent. Mature follicular fluid was obtained and stored in Trizol (Life
178 Technologies) from two donor women after oocyte collection during *in vitro* fertilisation
179 procedure at the Colombian Fertility and Sterility Centre (Bogotá, Colombia). Total RNA
180 extraction and cDNA synthesis (SuperScript III First-Strand kit, Life Technologies) were
181 carried out following the manufacturer's instructions.
182 PCR for ADAMTS19 and COL6A2 transcript presence was verified (reverse transcription
183 polymerase chain reaction, RT-PCR) using specific primers located on distinct exons which
184 were separated by introns encompassing >10000bp. All amplicons were directly sequenced
185 for confirming *ADAMTS19* and *COL6A2* sequences. In parallel, RT-PCR was performed
186 for pertinent housekeeping genes. Primer sequences and PCR conditions are available upon
187 request. Participants provided written informed consent.

188

189 *Cell culture and transfections*

190 Chinese hamster ovary (CHO) cells were grown in DMEM-F12 (Life Technologies)
191 medium supplemented with foetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin

192 (Invitrogen-Gibco). After trypsinisation, 6×10^6 cells/well were seeded on sterile cover
193 slips (24-well culture dishes) and transiently transfected, using FuGENE 6 transfection
194 reagent (Promega), with ADAMTS19-WT-pCDNA3.0/COL6A2-pCDNA3.0 or
195 ADAMTS19-T943I-pCDNA3.0/COL6A2-pCDNA3.0 plasmid combinations (200ng of
196 each plasmid). Non transfected cells were grown for testing basal expression of
197 ADAMTS19 and COL6A2. These assays were performed for downstream RT-PCR,
198 coimmunoprecipitation and colocalization experiments (indirect immunofluorescence) (see
199 below).

201 *Immunoprecipitation and antibodies*

202 CHO transfected cells were lysed using RIPA buffer and a cocktail of protease inhibitors
203 (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Extracts were quantified following the Pierce BCA
204 protein assay (Thermo Scientific). 400µg of total protein were incubated overnight (4°C)
205 with complexes of: ADAMTS19 primary antibody (2µg) (Santa Cruz Biotechnology, Inc-
206 sc 21513) and Immunocruz IP/WB Optima D system (sc-45041) (the ADAMTS19-
207 complex) or COL6A2 primary antibody (2µg) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, sc 374566)
208 and Immunocruz IP/WB Optima E system (sc-45042) (the COL6A2-complex).
209 Immunoprecipitates were washed four times in 1x RIPA and boiled in 2X SDS Laemmli
210 buffer. Eluates were then separated by SDS-PAGE using 5-10% acrylamide-bisacrylamide
211 gels. Proteins were electrotransferred onto PVDF membranes (Hybond-P GE Healthcare).
212 COL6A2 was revealed from the ADAMTS19-complex by using the sc-374566 primary
213 antibody while ADAMTS19 was revealed from the COL6A2-complex with the sc-21513
214 primary antibody. Experiments in both cases were performed using the SuperSignal West
215 Pico Chemiluminescent substrate system (Thermo Scientific). Coimmunoprecipitation

assays of proteins obtained from human follicular were performed using an identical protocol.

To establish potential ADAMTS19 and COL6A2 basal expression in CHO cells, western blots were carried using protein extracts from non-transfected populations, using the aforementioned primary antibodies.

221

Indirect immunofluorescence

After 48 hours of cotransfection, CHO cells seeded on cover slips were fixed with paraformaldehyde (4%) for 25 minutes, permeabilised with Triton-1X (1%) and blocked with BSA (1%). Cells were then incubated overnight (4°C) with ADAMTS19 (sc 21513, dilution 1:300, Santa Cruz Biotechnology, Inc) and COL6A2 (sc 374566, dilution 1:300, Santa Cruz Biotechnology, Inc) primary antibodies. After washing three times with 1X PBS, cells were incubated for 2 hours in the presence of secondary antibodies: donkey anti-goat IgG CFL594 (sc 362275, dilution 1:250, Santa Cruz Biotechnology, Inc) and goat anti-mouse IgG CFL 48 (sc 362257, dilution: 1/250, Santa Cruz Biotechnology, Inc). Cover slips were mounted on slides using UltraCruz Mounting Medium (Santa Cruz Biotechnology, Inc) which contains DAPI for nuclei staining.

Immunohistochemistry was performed on paraffin-embedded 2µm human ovarian sections using the Vectastain system kit (Vector Laboratories). Sections were dewaxed and fixed. Antigen retrieval was performed by boiling slides in sodium citrate buffer (10mM, pH 6-0), for 30 min. The slides were blocked using an Avidin/Biotin blocking Kit (Vector Laboratories, SP-2001) followed by protein blocking in 5% normal blocking serum (NS). The sections were incubated with primary anti-ADAMTS19 antibody (sc-21512, Santa Cruz Biotechnology, Inc) diluted 1/500. Secondary biotinylated horse anti-goat IgG (sc-

10

reproduction@bioscientifica.com

2023, Santa Cruz Biotechnology, Inc) antibody was added. Sections were then stained with
Fluorescein Avidin DCS (Vector Laboratories, A-2011). The same protocol was performed
for COL6A2 using primary anti-COL6A2 antibody diluted 1/500 (sc-83607, Santa Cruz
Biotechnology, Inc), biotinylated horse anti-goat IgG (sc-2018, Santa Cruz Biotechnology,
Inc) antibody and Texas Red Avidin DCS (Vector Laboratories, A-2016) antibody. The
cover slips were mounted with Vectashield mounting medium and DAPI (Vector
Laboratories, H-1200).
Slides were visualised using a fluorescent Nikon Eclipse NiE microscope and images were
captured with a Photometric (Coolnap EZ) digital camera using NIS-Elements Advanced
Research software.

250

251 *Ethical approval*

All the experimental steps of this study, involving animals and human samples, were
approved by the Universidad del Rosario's Ethics Committee (number: CEI-ABN026-
0000033) . Assays using human samples were conducted in line with the Declaration of
Helsinki.

256

257 **Results**

258

259 *Identification of ADAMTS19 putative partners*

Adamts19-Y2H experiments revealed Col6a2 and Col6a1 proteins as having high
probability scores (A and B PBS categories, respectively) to interact with Adamts19's bait
region (15 out 145 positive sequenced clones displayed Col6a1 or Col6a2 sequences).
Sequencing of the 130 positive remaining clones led to identify further candidate

11

reproduction@bioscientifica.com

264 polypeptides (n=14) in C through to F PBS categories but represented not-clearly
265 characterised proteins and/or were predicted to be short truncated fragments. Sequence
266 alignments and bioinformatics analysis of positive clones revealed a Col6a2 selected
267 interaction domain (SID) encompassing Gly⁵⁶⁷-Val⁶⁵⁶ residues. The SID for Col6a1
268 covered Arg⁵³⁰-Gln⁶⁷⁰ amino acids.

269

270 *ADAMTS19 and COL6A2 coexpression in ovary and transfected cells*

271 RT-PCR assays from CHO cells, transfected with *ADAMTS19* and *COL6A2* constructs,
272 shown positive results while control CHO non-transfected cells lacked the expression of
273 both genes (**Figure 1, en construction**). Coexpression of *ADAMTS19* and *COL6A2* was
274 also observed in adult mouse ovaries and mature human follicular fluid (**Figure 1, en**
275 **construction**).

276

277 *In vitro and in vivo interactions between ADAMTS19 and COL6A2*

278 *ADAMTS19* and *COL6A2* direct binding was confirmed by coimmunoprecipitation in
279 CHO cell cotransfection experiments (**Figure 2**). Similar findings were obtained when
280 *ADAMTS19*-T943I-pCDNA3.0 and *COL6A2*-pCDNA3.0 constructs were cotransfected,
281 which displayed that, at least *in vitro*, the *ADAMTS*-p.Thr943Ile mutation does not lead to
282 *ADAMTS19*/*COL6A2* interaction disturbances (data not shown). Positive interaction was
283 also observed in human follicular fluid (**Figure 2**).

284

285 *ADAMTS19 and COL6A2 colocalization*

286 CHO transfected cells displayed cytoplasmic colocalization of *ADAMTS19* and *COL6A2*
287 protein fragments (**Figure 3**). Human ovary immunolocalization showed that *COL6A2* was

12

reproduction@bioscientifica.com

located in theca cell layers and forming a thin structure (basal lamina) separating the granulosa and theca cells (Figure 4). Most ADAMTS19 staining was on the basal lamina. Merged images showed colocalization of ADAMTS19 and COL6A2 in the basal lamina. (Figure 4)

Discussion

ADAMTS enzymes have been linked to numerous biological processes, including ECM assembly and degradation, organogenesis, angiogenesis, coagulation and fertility. Substrates have not yet been described for some of them, (e.g. ADAMTS6, ADAMTS10, ADAMTS16, ADAMTS17, ADAMTS18 and ADAMTS19) (Kelwick *et al.*, 2015).

The present study involved an Y2H screening approach on a cDNA library of mouse adult ovaries to identify Adamts19 protein partners. That specific library was selected because previous studies have demonstrated *Adamts19* expression in mouse ovaries during development (E12.5-E14 stages) and at adulthood (Bouma *et al.*, 2004; Knauff *et al.*, 2009; Menke and Page, 2002). Our findings have demonstrated that ADAMTS19 directly interacts with COL6A2.

Type VI collagen is a family of protein isoforms including, in human species, helical chains encoded by six different genes (*COL6A1*, through *COL6A6*) (Cescon *et al.*, 2015; Ricard-Blum, 2011). COL6A2 consists of distinct domains, the signal peptide at the N-terminal end, the N-terminal globular domain, the triple-helical domain and the C-terminal globular domain. The globular domains are formed by ~200-residues of von Willebrand factor A motifs (VWA). We have found that the interaction region of COL6A2 with ADAMTS19 was located between Gly⁵⁶⁷-Val⁶⁵⁶ residues encompassing most of the triple helical domain

13

reproduction@bioscientifica.com

312 and a part of the 148-residue forming the C-terminal globular domain (**Figure 5**). Collagen
313 VI is expressed in an ubiquitous fashion as an ECM protein and can form part of the
314 microfibrillar network acting as binding membrane basement for the surrounding
315 connective tissue (Maraldi *et al.*, 2009) (and references therein). Furthermore, it has been
316 observed that collagen VI undergoes unique multi-step supra-molecular assembly leading
317 to the synthesis of beaded microfilaments having additional functions in a cell, such as
318 apoptosis inhibition, differentiation modulation and protection against oxidative stress
319 (Cescon *et al.*, 2015). This protein (conversely to other collagens) is processed
320 intracellularly: triple-helix monomers are first established and then assembled as
321 antiparallel dimers which are stabilised by disulphide bonds to form large tetramers. These
322 complexes are then secreted to the extracellular space to form microfilaments.

323 In the ovary, type VI collagen has been observed in theca cell layers during follicular
324 development, especially in those surrounding pre-ovulatory follicles, suggesting a relevant
325 role during follicular development/maturation and ovulation (Iwahashi *et al.*, 2000). Our
326 immunofluorescence experiments on human ovarian tissue have revealed that ADAMTS19
327 and COL6A2 are colocalised in a clear thin structure, the basal laminae, separating the
328 granulosa cell compartment and the theca cell layers, especially of secondary follicles
329 (**Figure 4**). These findings, as well as the presence of an ADAMTS19/COL6A2 complex in
330 the follicular fluid argues in favour of a key role for ADAMTS19 during follicular
331 development and ovulation, as well as strongly suggest that COL6A2 might be the
332 substrate for ADAMTS19's protease function. We therefore hypothesise that ADAMTS19
333 enzymatic activity on COL6A2 microfibers in growing follicles participates in the normal
334 expansion of the basal lamina, thereby permitting granulosa cell proliferation. Distinct
335 types of collagens (e.g. IV and XVIII) are expressed in the basal lamina which has been

336 linked to important functions during follicle development (Berkholtz *et al.*, 2006; Irving-
337 Rodgers *et al.*, 2008; Nakano *et al.*, 2007). Furthermore, it has been shown that the ovarian
338 follicular basal lamina phenotype in mice is related to oocyte developmental competence
339 (Irving-Rodgers *et al.*, 2008). Interestingly, it has been recently reported that ECM collagen
340 regulation in the ovary by FOXL2 (a key actor of female fertility) is important for follicle
341 maturation (Marongiu *et al.*, 2016).

342 ADAMTS19 might act as an N-procollagen proteinase participating in the extracellular
343 removal of amino propeptides from fibril-forming procollagens (Bekhouche and Colige,
344 2015). Such assumption is coherent since evolutionary comparisons of sequences have led
345 to proposing that Adamts17 (the most closely related factor to Adamts19) might be related
346 to ECM fibrillin microfibril biogenesis (Hubmacher and Apte, 2011; Russell *et al.*, 2015).

347 It might also be possible that ADAMTS19 contributes to collagen VI degradation and EMC
348 turnover since the Col6a2 SID included a predicted VWA domain which has been
349 described as being relevant for ADAMTS (e.g. ADAMTS13) recognition and cleavage
350 (Soejima, 2003). ADAMTS19 might therefore act as an important molecule during follicle
351 development contributing to create physiological conditions for granulosa cells maturation
352 and growth.

353 These results, as well as previous reports displaying a potential link between mutant
354 ADAMTS19 and human ovarian diseases (e.g. POI), led us to test potential interaction
355 disturbances between ADAMTS19 and COL6A2 caused by the ADAMTS-p.Thr943Ile
356 mutation described by Fonseca *et al.*, in a POI patient (Fonseca *et al.*, 2015; Knauff *et al.*,
357 2009; Pyun *et al.*, 2013, 2015). Although coimmunoprecipitation assays did not reveal a
358 functional effect for the p.Thr943Ile mutation, its potential role during POI pathogenesis
359 cannot be completely discarded since this mutation might lead to abnormal folding, thereby

360 affecting binding to other partners (COL6A1) and/or perturb the protein's catalytic activity.
361 Concerning COL6A1 (the second protein partner identified in Y2H assays), we estimate
362 that it might also represent a substrate for ADAMTS19 activity.

363

364 Taken together, our results are the first to describe ADAMTS19 interacting proteins, adding
365 thus new insights regarding its role in ovarian biology.

366

367 **Declaration of Interest**

368 The authors declare no conflict of interest

369

370 **Funding**

371 This study was supported by the Universidad del Rosario, Grant CS/CIGGUR-ABN062-
372 2016.

373

374 **References**

- 375 Apte SS, Parks WC. Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an
376 outlook for the future. *Matrix Biol* 2015;**44-46**:1–6.
- 377 Bekhouche M, Colige A. The procollagen N-proteinases ADAMTS2, 3 and 14 in
378 pathophysiology. *Matrix Biol* 2015;**44-46**:46–53.
- 379 Berkholtz C, Shea L, Woodruff T. Extracellular Matrix Functions in Follicle Maturation.
380 *Semin Reprod Med* 2006;**24**:262–269.
- 381 Bouma GJ, Hart GT, Washburn LL, Recknagel AK, Eicher EM. Using real time RT-PCR
382 analysis to determine multiple gene expression patterns during XX and XY mouse
383 fetal gonad development. *Gene Expr Patterns* 2004;**5**:141–149.

- 384 Cal S, Obaya AJ, Llamazares M, Garabaya C, Quesada V, López-Otín C. Cloning,
385 expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs,
386 a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene*
387 2002;**283**:49–62.
- 388 Cawston TE, Young DA. Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone
389 breakdown. *Cell Tissue Res* 2010;**339**:221–235.
- 390 Cescon M, Gattazzo F, Chen P, Bonaldo P. Collagen VI at a glance. *J Cell Sci*
391 2015;**128**:3525–3531.
- 392 Colige A, Ruggiero F, Vandenberghe I, Dubail J, Kesteloot F, Van Beeumen J, Beschin A,
393 Brys L, Lapiere CM, Nusgens B. Domains and Maturation Processes That Regulate
394 the Activity of ADAMTS-2, a Metalloproteinase Cleaving the Aminopropeptide of
395 Fibrillar Procollagens Types I-III and V. *J Biol Chem* 2005;**280**:34397–34408.
- 396 Daley WP, Yamada KM. ECM-modulated cellular dynamics as a driving force for tissue
397 morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2013;**23**:408–414.
- 398 Dubail J, Apte SS. Insights on ADAMTS proteases and ADAMTS-like proteins from
399 mammalian genetics. *Matrix Biol* 2015;**44-46**:24–37.
- 400 Fonseca DJ, Patiño LC, Suárez YC, de Jesús Rodríguez A, Mateus HE, Jiménez KM,
401 Ortega-Recalde O, Díaz-Yamal I, Laissue P. Next generation sequencing in women
402 affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative
403 genes and mutations. *Fertil Steril* 2015;**104**:154–162.e2.
- 404 Fontanil T, Rua S, Llamazares M, Moncada-Pazos A, Quiros PM, Garcia-Suarez O, Vega
405 JA, Sasaki T, Mohamedi Y, Esteban MM, *et al.* Interaction between the ADAMTS-12
406 metalloprotease and fibulin-2 induces tumor-suppressive effects in breast cancer cells.
407 *Oncotarget* 2014;**5**:1253–1264.

- 408 Formstecher E. Protein interaction mapping: A *Drosophila* case study. *Genome Res*
409 2005;15:376–384.
- 410 Fromont-Racine M, Rain J-C, Legrain P. Toward a functional analysis of the yeast genome
411 through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet* 1997;16:277–282.
- 412 Guo F, Lai Y, Tian Q, Lin EA, Kong L, Liu C. Granulin-epithelin precursor (GEP) binds
413 directly to ADAMTS-7 and ADAMTS-12 and inhibits their degradation of cartilage
414 oligomeric matrix protein. *Arthritis Rheum* 2010;n/a–n/a.
- 415 Hubmacher D, Apte SS. Genetic and functional linkage between ADAMTS superfamily
416 proteins and fibrillin-1: a novel mechanism influencing microfibril assembly and
417 function. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:3137–3148.
- 418 Irving-Rodgers HF, Morris S, Collett RA, Peura TT, Davy M, Thompson JG, Mason HD,
419 Rodgers RJ. Phenotypes of the ovarian follicular basal lamina predict developmental
420 competence of oocytes. *Hum Reprod* 2008;24:936–944.
- 421 Iwahashi M, Muragaki Y, Ooshima A, Nakano R. Type VI collagen expression during
422 growth of human ovarian follicles. *Fertil Steril* 2000;74:343–7.
- 423 Kelwick R, Desanlis I, Wheeler GN, Edwards DR. The ADAMTS (A Disintegrin and
424 Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol* 2015;16:113.
- 425 Knauff EAH, Franke L, van Es MA, van den Berg LH, van der Schouw YT, Laven JSE,
426 Lambalk CB, Hoek A, Goverde AJ, Christin-Maitre S, *et al.* Genome-wide association
427 study in premature ovarian failure patients suggests ADAMTS19 as a possible
428 candidate gene. *Hum Reprod* 2009;24:2372–2378.
- 429 Kuno K, Matsushima K. ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through
430 the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *J Biol Chem*
431 1998;273:13912–7.

- 432 Lee N V., Rodriguez-Manzaneque JC, Thai SN-M, Twal WO, Luque A, Lyons KM,
433 Argraves WS, Iruela-Arispe ML. Fibulin-1 Acts as a Cofactor for the Matrix
434 Metalloprotease ADAMTS-1. *J Biol Chem* 2005;**280**:34796–34804.
- 435 Liu C-J, Kong W, Ilalov K, Yu S, Xu K, Prazak L, Fajardo M, Sehgal B, Di Cesare PE.
436 ADAMTS-7: a metalloproteinase that directly binds to and degrades cartilage
437 oligomeric matrix protein. *FASEB J* 2006;**20**:988–90.
- 438 Maraldi NM, Sabatelli P, Columbaro M, Zamparelli A, Manzoli FA, Bernardi P, Bonaldo
439 P, Merlini L. Collagen VI myopathies: From the animal model to the clinical trial. *Adv*
440 *Enzyme Regul* 2009;**49**:197–211.
- 441 Marongiu M, Deiana M, Marcia L, Sbardellati A, Asunis I, Meloni A, Angius A, Cusano R,
442 Loi A, Crobu F, *et al.* Novel action of FOXL2 as mediator of Col1a2 gene
443 autoregulation. *Dev Biol* 2016;**416**:200–211.
- 444 McClelland KS, Wainwright EN, Bowles J, Koopman P. Rapid Screening of Gene
445 Function by Systemic Delivery of Morpholino Oligonucleotides to Live Mouse
446 Embryos. Schubert M (ed). *PLoS One* 2015;**10**:e0114932.
- 447 Menke DB, Page DC. Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad.
448 *Gene Expr Patterns* 2002;**2**:359–67.
- 449 Nakano K, Naito I, Momota R, Sado Y, Hasegawa H, Ninomiya Y, Ohtsuka A. The
450 distribution of type IV collagen alpha chains in the mouse ovary and its correlation
451 with follicular development. *Arch Histol Cytol* 2007;**70**:243–53.
- 452 Ortega-Recalde O, Moreno MB, Vergara JJ, Fonseca DJ, Rojas RF, Mosquera H, Medina
453 CL, Restrepo CM, Laissue P. A novel TGM1 mutation, leading to multiple splicing
454 rearrangements, is associated with autosomal recessive congenital ichthyosis. *Clin Exp*
455 *Dermatol* 2015;**40**:757–760.

- 456 Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases.
457 *Biochem J* 2005;**386**:15–27.
- 458 Pyun J-A, Kim S, Cha DH, Kwack K. Epistasis between IGF2R and ADAMTS19
459 polymorphisms associates with premature ovarian failure. *Hum Reprod*
460 2013;**28**:3146–3154.
- 461 Pyun J-A, Kim S, Kwack K. Epistasis between polymorphisms in ACVR2B and
462 ADAMTS19 is associated with premature ovarian failure. *Menopause* 2015;**22**:212–
463 216.
- 464 Rain JC, Selig L, De Reuse H, Battaglia V, Reverdy C, Simon S, Lenzen G, Petel F,
465 Wojcik J, Schächter V, *et al.* The protein-protein interaction map of *Helicobacter*
466 *pylori*. *Nature* 2001;**409**:211–5.
- 467 Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;**3**:a004978–
468 a004978.
- 469 Russell DL, Brown HM, Dunning KR. ADAMTS proteases in fertility. *Matrix Biol*
470 2015;**44–46**:54–63.
- 471 Soejima K. ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von
472 Willebrand factor cleavage. *Blood* 2003;**102**:3232–3237.
- 473 Wojcik J, Boneca IG, Legrain P. Prediction, assessment and validation of protein
474 interaction maps in bacteria. *J Mol Biol* 2002;**323**:763–70.
- 475 Yue B. Biology of the Extracellular Matrix. *J Glaucoma* 2014;**23**:S20–S23.

476
477 **Figure Legends**
478

479 **Figure 1. *ADAMTS19* and *COL6A2* expression.** RT-PCR were performed using specific
480 primers for ADAMTS19 and COL6A2 on total RNA isolated from A) Human follicular
481 fluid; B) mouse ovaries and; C) CHO transfected cells with ADAMTS19-WT-pCDNA3.0
482 or COL6A2-pCDNA3.0 constructs. *GAPDH*: housekeeping. L: ladder; NT: CHO non-
483 transfected cells.

484
485 **Figure 2. Coimmunoprecipitation assays of ADAMTS19 and COL6A2.**

486 A) CHO transfected cells with ADAMTS19-WT-pCDNA3.0 and COL6A2-pCDNA3.0
487 constructs (57 and 35 KDa, respectively) B) Human follicular fluid displaying
488 ADAMTS19 and COL6A2 (133 and 126 KDa, respectively). Extracts were incubated with
489 anti-ADAMTS19 or anti-COL6A2 antibodies. Following precipitation, proteins were
490 resolved by SDS-PAGE and detected with anti-COL6A2 or anti-ADAMTS19 antibodies.
491 Cell lysates served as positive control.

492
493 **Figure 3. ADAMTS19 and COL6A2 colocalization in CHO transfected cells.** A) DAPI
494 B) COL6A2 antibody C) ADAMTS19 antibody and D) Merge.

495
496 **Figure 4. ADAMTS19 and COL6A2 immunocolocalization in human ovarian tissue.**
497 A) DAPI B) COL6A2 antibody C) ADAMTS19 antibody and D) Merge. * yellow: basal
498 lamina; * red: granulosa cells; blue: * theca cells; *green: ovarian stroma; * white:
499 follicle external limit.

500

501 **Figure 5.** Schematic illustration of the interaction between human ADAMTS19 and
502 COL6A2. SP: signal peptide; Cys-rich: cysteine-rich region; TSR: thrombospondin-like
503 repeats; VWA: Von Willebrand factor type A domain.

504

505 **Supplementary Figure S1.** Sequence alignments of human and mouse ADAMTS19
506 proteins. Yellow: human region cloned for subsequent transfection experiments. Blue:
507 mouse region used for Y2H assay.

508

509 **Supplementary Figure S2.** Sequence alignments of human and mouse COL6A2 proteins.
510 Yellow: human region cloned for subsequent transfection experiments. Blue: mouse SID
511 region identified in Y2H assay.

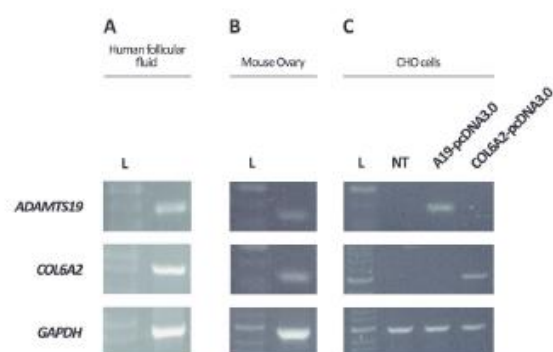


Figure 1. ADAMTS19 and COL6A2 expression. RT-PCR were performed using specific primers for ADAMTS19 and COL6A2 on total RNA isolated from A) Human follicular fluid; B) mouse ovaries and; C) CHO transfected cells with ADAMTS19-WT-pCDNA3.0 or COL6A2-pCDNA3.0 constructs. GAPDH: housekeeping. L: ladder; NT: CHO non-transfected cells.

279x215mm (300 x 300 DPI)

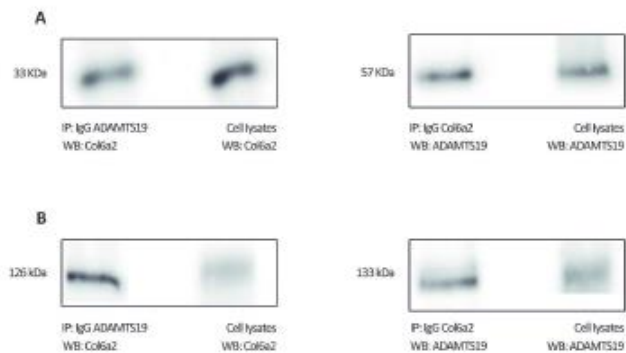


Figure 2. Coimmunoprecipitation assays of ADAMTS19 and COL6A2. A) CHO transfected cells with ADAMTS19-WT-pCDNA3.0 and COL6A2-pCDNA3.0 constructs (57 and 35 KDa, respectively) B) Human follicular fluid displaying ADAMTS19 and COL6A2 (133 and 126 KDa, respectively). Extracts were incubated with anti-ADAMTS19 or anti-COL6A2 antibodies. Following precipitation, proteins were resolved by SDS-PAGE and detected with anti-COL6A2 or anti-ADAMTS19 antibodies. Cell lysates served as positive control.

279x215mm (300 x 300 DPI)

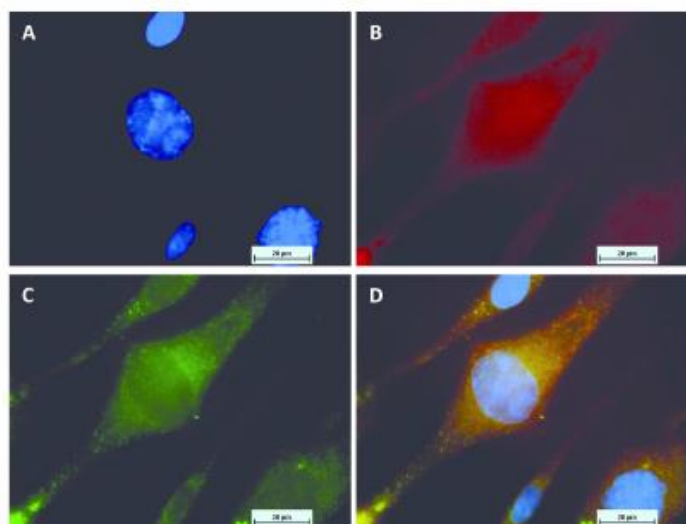


Figure 3. ADAMTS19 and COL6A2 colocalization in CHO transfected cells. A) DAPI B) COL6A2 antibody C) ADAMTS19 antibody and D) Merge.

279x215mm (300 x 300 DPI)

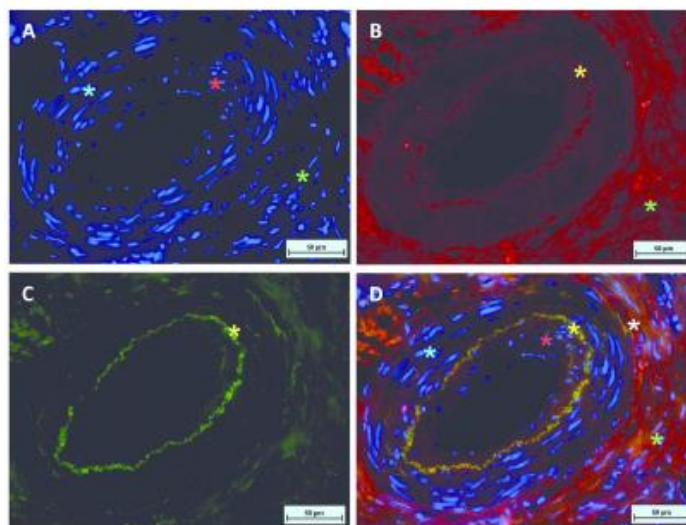


Figure 4. ADAMTS19 and COL6A2 immunocolocalization in human ovarian tissue. A) DAPI B) COL6A2 antibody C) ADAMTS19 antibody and D) Merge. * yellow: basal lamina; * red: granulosa cells; blue: * theca cells; *green: ovarian stroma; * white: follicle external limit.

279x215mm (300 x 300 DPI)

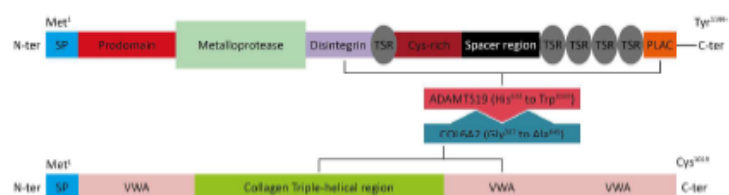


Figure 5. Schematic illustration of the interaction between human ADAMTS19 and COL6A2. SP: signal peptide; Cys-rich: cysteine-rich region; TSR: thrombospondin-like repeats; VWA: Von Willebrand factor type A domain.

274x72mm (300 x 300 DPI)

<i>Homo sapiens</i>	EGEECKRLDPPMDGTUCDLGRMCKAGECTRTTAPKELAGHMLMSTCSRTSEALIS	655
<i>Mus musculus</i>	EGEAECKRLDPPMDGTUCDGRMCKAGECTRTTAPKELAGHMLMSTCSRTSEALIS	658
*** *****		
<i>Homo sapiens</i>	REKCPMLDSEARDCKHPPQVHICENITCEALIGRPMWQDAVEVTSTPHILQWKA	715
<i>Mus musculus</i>	REKCPMLDSEARDCKHPPQVHICENITCEALIGRPMWQDAVEVTSTPHILQWKA	718

<i>Homo sapiens</i>	VLDEKICALCEPFWKEQFILLREKVMGITSQYQALDIAMREKQVPRDILGLSLAR	775
<i>Mus musculus</i>	VLDEKICALCEPFWKEQFILLREKVMGITSQYQALDIAMREKQVPRDILGLSLAR	778
* *****		
<i>Homo sapiens</i>	LNHCPVNGAKESCKIIRGDSHETGAGVEMLVINGARLKVVEEPASRYLALSDG	835
<i>Mus musculus</i>	LNHCPVNGAKESCKIIRGDSHETGAGVEMLVINGARLKVVEEPASRYLALSDG	838

<i>Homo sapiens</i>	EGCINGDWGIERGGAFNLAGTIVHYVPRILMERISANGPITALLHLVLLPQDQVGLAT	895
<i>Mus musculus</i>	EGCINGDWGIERGGAFNLAGTIVHYVPRILMERISANGPITALLHLVLLPQDQVGLAT	898

<i>Homo sapiens</i>	KYTLSDPLLNQSEKAFELINMHTSWECDATGQDEKTIYSEKIMEKNISIVN	955
<i>Mus musculus</i>	KYTLSDPLLNQSEKAFELINMHTSWECDATGQDEKTIYSEKIMEKNISIVN	958
*** *****		
<i>Homo sapiens</i>	EGQYLWKEGQIRKCEPFOCTEMHHTHTPQRTQNGKQSOVACTOGLRITLTA	1015
<i>Mus musculus</i>	EGQYLWKEGQIRKCEPFOCTEMHHTHTPQRTQNGKQSOVACTOGLRITLTA	1018
*** *****		
<i>Homo sapiens</i>	RAHKLINHTVAPQKCEKQKIPHYWLAAYWSESEVPEKQIHNNVYKUNTPKKNLETP	1075
<i>Mus musculus</i>	RAHKLINHTVAPQKCEKQKIPHYWLAAYWSESEVPEKQIHNNVYKUNTPKKNLETP	1078

<i>Homo sapiens</i>	EPFAEDCKDTERCTYNNHINMKCEITQWPKQEKVIGCMKLTQPRHNECFSEKPAAY	1135
<i>Mus musculus</i>	EPFAEDCKDTERCTYNNHINMKCEITQWPKQEKVIGCMKLTQPRHNECFSEKPAAY	1138

<i>Homo sapiens</i>	EPQRLQCHERINNNHTSHLAALTRIGLQWVYCRVIREKNLCQDSWYQCCETC	1195
<i>Mus musculus</i>	EPQRLQCHERINNNHTSHLAALTRIGLQWVYCRVIREKNLCQDSWYQCCETC	1198

150x162mm (300 x 300 DPI)

148x112mm (300 x 300 DPI)

11. Bibliografía

- Adriaenssens T, Mazoyer C, Segers I, Wathlet S, Smits J, Blanche G. 2009. Differences in Collagen Expression in Cumulus Cells after Exposure to Highly Purified Menotropin or Recombinant Follicle-Stimulating Hormone in a Mouse Follicle Culture Model 1. *Biol Reprod* 1025:1015–1025.
- Aittomäki K, Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, Kaskikari R, Sankila EM, Lehtväslaiho H, Engel AR, Nieschlag E, Huhtaniemi I, et al. 1995. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 82:959–68.
- Allen EG, Sullivan AK, Marcus M, Small C, Dominguez C, Epstein MP, Charen K, He W, Taylor KC, Sherman SL. 2007. Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1 premutation. *Hum Reprod* 22:2142–2152.
- Allen LA, Achermann JC, Pakarinen P, Kotlar TJ, Huhtaniemi IT, Jameson JL, Cheetham TD, Ball SG. 2003. A novel loss of function mutation in exon 10 of the FSH receptor gene causing hypergonadotrophic hypogonadism: clinical and molecular characteristics. *Hum Reprod* 18:251–256.
- Amato P, Roberts AC, D M. 2001. Transient ovarian failure: a complication of uterine artery embolization. *Fertil Steril* 75:438–439.
- Anders A, Gilbert S, Garten W, Postina R, Fahrenholz F. 2001. Regulation of the α -secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J* 15:1837–1839.
- Apte SS. 2009. A Disintegrin-like and Metalloprotease Thrombospondin Type 1 Motif (ADAMTS) Superfamily: Functions and Mechanisms *. *J Biol Chem* 284:31493–31497.
- Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL. 2002. A 2002 Perspective. *Endocr Rev* 23:141–174.
- Aten RF, Kolodecik TR, Macdonald GJ, Behrman HR. 1995. Modulation of Cholesteryl Ester Hydrolase Messenger Ribonucleic Acid Levels, Protein Levels, and Activity in the Rat Corpus Luteum '. *Biol Reprod* 1117:1110–1117.
- Augustin HG, Braun K, Telemenakis I, Modlich U. 1995. Ovarian Angiogenesis Phenotypic Characterization of Endothelial Cells in a Physiological Model of Blood Vessel Growth and Regression. *Am J Pathol* 147:339–351.
- Ayad S, Marriott a, Morgan K, Grant ME. 1989. Bovine cartilage types VI and IX collagens. Characterization of their forms in vivo. *Biochem J* 262:753–761.
- Badenas C, Quinto L, Puigoriol E, Tazo B, Rife M, Sa A, Mila M. 2004. Analysis of CGG variation through 642 meioses in Fragile X families. *Mol Hum Reprod* 10:773–776.
- Baere E De, Beysen D, Oley C, Lorenz B, Cocquet J, Sutter P De, Devriendt K, Dixon M,

- Fellous M, Fryns J-P, Garza A, Jonsrud C, et al. 2003. FOXL2 and BPES: mutational hotspots, phenotypic variability, and revision of the genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 72:478–87.
- Baerwald AR, Adams GP, Pierson R a. 2012. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: A review. *Hum Reprod Update* 18:73–91.
- Bakalov VK, Anasti JN, Calis KA, Pharm D. 2005. Autoimmune oophoritis as a mechanism of follicular dysfunction in women with 46 , XX spontaneous premature ovarian failure. *Fertil Steril* 84:.
- Baker AH, Edwards DR, Murphy G. 2002. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 115:3719–3727.
- Ball AR, Chen Y, Yokomori K. 2014. Biochimica et Biophysica Acta Mechanisms of cohesin-mediated gene regulation and lessons learned from cohesinopathies ☆. *BBA - Gene Regul Mech* 1–12.
- Bardhan A. 2010. Many functions of the meiotic cohesin Central element. *Chromosom Res* 18:909–924.
- Barlow C, Hirotsune S, Paylor R, Liyanage M, Eckhaus M, Collins F, Shiloh Y, Crawley JN, Ried T, Tagle D, Wynshaw-Boris A. 1996. Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* 86:159–71.
- Barnett KR, Schilling C, Greenfeld CR, Tomic D, Flaws JA. 2006. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod Update* 12:537–55.
- Bayne RAL, Martins da Silva SJ, Anderson RA. 2004. Increased expression of the FIGLA transcription factor is associated with primordial follicle formation in the human fetal ovary. *Mol Hum Reprod* 10:373–81.
- Beau I, Touraine P, Meduri G, Gougeon A, Desroches A, Matuchansky C, Milgrom E, Kuttenn F, Misrahi M. 1998. A Novel Phenotype Related to Partial Loss of Function Mutations of the Follicle Stimulating Hormone Receptor. *J Clin Invest* 102:1352–1359.
- Bedell MA, Brannan CI, Evans EP, Copeland NG, Jenkins NA, Donovan PJ. 1995. DNA rearrangements located over 100 kb 5' of the Steel (Sl)-coding region in Steel-panda and Steel-contrasted mice deregulate Sl expression and cause female sterility by disrupting ovarian follicle development. *Genes Dev* 9:455–70.
- Bell M V, Hirst MC, Nakahori Y, Jacobs PA, Tommerup N, Tranebjaerg L, Kerr B, Turner G, Lindenbaum RH, Thibodeau S. 1991. Physical Mapping across the Fragile X : Hypermethylation and Clinical Expression of the Fragile X Syndrome. *Cell* 64:861–866.
- Benayoun BA, Georges AB, L'Hôte D, Andersson N, Dipietromaria A, Todeschini A-L, Caburet S, Bazin C, Anttonen M, Veitia RA. 2011. Transcription factor FOXL2 protects granulosa cells from stress and delays cell cycle: role of its regulation by the SIRT1 deacetylase. *Hum Mol Genet* 20:1673–86.

- Bevitt DJ, Li Z, Lindrop JL, Barker MD, Clarke MP, Mckie N. 2005. Analysis of full length ADAMTS6 transcript reveals alternative splicing and a role for the 5' untranslated region in translational control. *B. Gene* 359:99–110.
- Bharath R, Unnikrishnan AG, Thampy M V, Anilkumar A, Nisha B, Praveen VP, Nair V, Jayakumar R V, Kumar H, Turner TA, Distribution SV-. 2010. Turner Syndrome and its Variants. 77:2008–2010.
- Bouilly J, Bachelot A, Broutin I, Touraine P, Binart N. 2011. Novel NOBOX loss-of-function mutations account for 6.2% of cases in a large primary ovarian insufficiency cohort. *Hum Mutat* 32:1108–13.
- Bouilly J, Roucher-Boulez Gompel, Bry-Gauillard F, Hélène A, Azibi K, Beldjord C, Dodé C, Bouligand J, Mantel AG, Hécart A-C, Delemer B, Young J, et al. 2015. New NOBOX Mutations identified in a Large Cohort decrease KIT-L Expression. *J Clin Endocrinol Metab* 10:1–9.
- Bouma GJ, Albrecht KH, Washburn LL, Recknagel AK, Churchill GA, Eicher EM. 2005. Gonadal sex reversal in mutant Dax1 XY mice: a failure to upregulate Sox9 in pre-Sertoli cells. *Development* 132:3045–3054.
- Bouma GJ, Hart GT, Washburn LL, Recknagel AK, Eicher EM. 2004. Using real time RT-PCR analysis to determine multiple gene expression patterns during XX and XY mouse fetal gonad development. *Gene Expr Patterns* 5:141–149.
- Brannstrom M, Woessner JF, Koos RD. 1988. Inhibitors of Mammalian Tissue Collagenase and Metalloproteinases Suppress Ovulation in the Perfused Rat Ovary *. *Endocrinology* 122:.
- Brocker CN, Vasiliou V, Nebert DW. 2009. Evolutionary divergence and functions of the ADAM and ADAMTS gene families. *Hum Genomics* 4:43–55.
- Brooks PC, Stro S, Sanders LC, Schalscha TL Von, Aimes RT, Stetler-stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA. 1996. Localization of Matrix Metalloproteinase MMP-2 to the Surface of Invasive Cells by Interaction with Integrin $\alpha_5\beta_1$. *Cell* 85:683–693.
- Bruns R, Lu G, Pugsley T. 1986. Characterization of the A2 adenosine receptor labeled by [3H]NECA in rat striatal membranes. *Mol Pharmacol* 4:331–346.
- Burks DJ, Mora JF De, Schubert M, Withers DJ, Myers MG, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. 2000. IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. 407:377–382.
- Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, Harrison I, Vaiman D, Ben-Neriah Z, García-Tuñón I, Fellous M, Pendás AM, et al. 2014. Mutant Cohesin in Premature Ovarian Failure. *N Engl J Med* 10:943–949.
- Caburet S, Zavadakova P, Ben-Neriah Z, Bouhali K, Dipietromaria A, Charon C, Besse C, Laissue P, Chalifa-Caspi V, Christin-Maitre S, Vaiman D, Levi G, et al. 2012. Genome-Wide Linkage in a Highly Consanguineous Pedigree Reveals Two Novel Loci on Chromosome 7 for Non-Syndromic Familial Premature Ovarian Failure. *PLoS*

One 7:1–6.

- Cal S, Obaya AJ, Llamazares M, Garabaya C, Quesada V, Carlos Lopez-Otin. 2002. Cloning , expression analysis , and structural characterization of seven novel human ADAMTSs , a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene* 283:49–62.
- Carre G, Couty I, Hennequet-antier C, Govoroun MS. 2011. Gene Expression Profiling Reveals New Potential Players of Gonad Differentiation in the Chicken Embryo. *PLoS One* 6:1–12.
- Chang H, Brown CW, Matzuk MM. 2002. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 23:787–823.
- Choi J, Smitz J. 2014. Molecular and Cellular Endocrinology Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin : Origins of difference. *Mol Cell Endocrinol* 383:203–213.
- Choi Y, Rajkovic A. 2006. Characterization of NOBOX DNA binding specificity and its regulation of Gdf9 and Pou5f1 promoters. *J Biol Chem* 281:35747–56.
- Christin-Maitre S, Vasseur C, Portnoi M-F, Bouchard P. 1998. Genes and premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol* 145:75–80.
- Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJ. 1996. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 137:1447–56.
- Connell MRO, Roland Gamsjaeger, Mackay JP. 2009. The structural analysis of protein – protein interactions by NMR spectroscopy. *Proteomics* 9:5224–5232.
- Conway GS. 2000. Premature ovarian failure. *Br Med Bull* 56:643–649.
- Cordts EB, Christofolini DM, Santos AA Dos, Bianco B, Barbosa CP. 2011. Genetic aspects of premature ovarian failure: A literature review. *Arch Gynecol Obstet* 283:635–643.
- Correa SM, Washburn LL, Kahlon RS, Musson MC, Bouma GJ, Eicher EM, Albrecht KH. 2012. Sex reversal in C57BL/6J XY mice caused by increased expression of ovarian genes and insufficient activation of the testis determining pathway. *PLoS Genet* 8:.
- Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF. 1986. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 67:604–6.
- Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, Ristaldi MS, Marzella R, et al. 2001. The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 27:159–66.
- Curry TE, Osteen KG. 2001. Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biol Reprod* 64:1285–1296.
- Daley WP, Peters SB, Larsen M. 2008. Extracellular matrix dynamics in development and

- regenerative medicine. *J Cell Sci* 121:255–64.
- David Vantman B, Margarita Vega B. 2010. Fisiología reproductiva y cambios evolutivos con la edad de la mujer. *Rev Médica Clínica Las Condes* 21:348–362.
- Davies J a. 2001. Extracellular Matrix. *Encycl Life Sci* 1–7.
- Diaz FJ, Wigglesworth K, Eppig JJ. 2007. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. 1330–1340.
- Dijke P, Arthur HM. 2007. Extracellular control of TGF β signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:857–869.
- Doherty E, Pakarinen P, Tiitinen A, Kiilavuori A, Huhtaniemi I, Forrest S, Aittoma K. 2002. A Novel Mutation in the FSH Receptor Inhibiting Signal Transduction and Causing Primary Ovarian Failure. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1151–1155.
- Doyle KMH, Russell DL, Sriraman V, Richards JS. 2015. Coordinate Transcription of the ADAMTS-1 Gene by Luteinizing Hormone and Progesterone Receptor. *Mol Endocrinol* 18(10):2463–2478.
- Droesch K, Navot D, Scott R, Kreiner D, Liu H, Rosenwaks Z. 1988. Transdermal estrogen replacement in ovarian failure for ovum donation. *Fertil Steril* 259:1353–1356.
- Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. 1998. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* 12:1809–17.
- Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. 2016. The Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Is X-Linked and Expressed in Oocytes. *Mol Endocrinol* 12:1809–1817.
- Edson M a., Nagaraja AK, Matzuk MM. 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev* 30:624–712.
- Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. 2009. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29:258–289.
- Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM. 2010. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr Opin Cell Biol* 22:697–706.
- Elsheikh M, Dunger DB, Conway GS, Wass JAH, Infirmiry R, Kingdom U. 2015. Turner 's Syndrome in Adulthood. *Endocr Rev* 23:120–140.
- Elvin JA, Yan C, Wang P, Nishimori K, Matzuk MM. 1999. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Mol Endocrinol* 13:1018–34.
- Erickson GF, Shimasaki S. 2003. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 20:1–20.

- Espey LL, Yoshioka S, Russell DL, Robker RL, Fujii S, Richards JS. 2000. Ovarian Expression of a Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs During Ovulation in the Gonadotropin-Primed Immature Rat 1. *Biol Reprod* 1095:1090–1095.
- Farin CE, Moeller CL, Sawyer HR, Niswender GD. 1986. Morphometric Analysis of Cell Types in the Ovine throughout the Estrous Cycle ' Corpus Luteum. *Biol Reprod* 35:1299–1308.
- Fechner PY, Davenport ML, Qualy RL, Ross JL, Gunther DF, Eugster EA, Huseman C, Zagar AJ, Quigley CA. 2006. Differences in Follicle-Stimulating Hormone Secretion between 45 , X Monosomy Turner Syndrome and and 45, X/46, XX mosaicism are evident at an early age. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4896–4902.
- Fernandes RJ, Hirohata S, Engle JM, Colige A, Cohn DH, Eyre DR, Apte SS. 2001. Procollagen II Amino Propeptide Processing by ADAMTS-3. *Biochem Mol Biol* 276:31502–31509.
- Fields S, Song O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 245–246.
- Flannery CR, Zeng W, Corcoran C, Collins-racie LA, Chockalingam PS, Hebert T, Mackie SA, Mcdonagh T, Crawford TK, Tomkinson KN, Lavallie ER, Morris EA, et al. 2002. Autocatalytic Cleavage of ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) Reveals Multiple Glycosaminoglycan-binding Sites *. *J Biol Chem* 277:42775–42780.
- Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-otín C. 2004. Matrix metalloproteinases in cancer : from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 48:411–424.
- Fonseca DJ, Patiño LC, Suárez Y, Rodríguez A, Mateus H, Jiménez KM, O O-R, Díaz-Yamal I, Laissue P. 2015. Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations. *Fertil Steril* 104:154–62.
- Fortune JE, Willis EL, Bridges PJ, Yang CS. 2010. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. *Anim Reprod* 6:60–71.
- Freimann S, Ben-Ami I, Dantes A, Armon L, YaŌcov-Klein A Ben, Ron-El R, Amsterdam A. 2005. Differential expression of genes coding for EGF-like factors and ADAMTS1 following gonadotropin stimulation in normal and transformed human granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 333:935–943.
- Friedl P, Gilmour D. 2009. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:445–457.
- G. Meduri P, Touraine I, Beau O, Lahuna A, Desroches M, Vacher-lavenuF. C, Kuttenn, Misrahi. 2003. Delayed Puberty and Primary Amenorrhea Associated with a Novel Mutation of the Human Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Clinical ,

- Histological , and Molecular Studies. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3491–3498.
- Gao G, Plaas A, Thompson VP, Jin S, Zuo F, Sandy JD, Gao G, Plaas A, Thompson VP, Jin S, Zuo F, Sandy JD. 2004. Glycobiology and Extracellular Matrices : the Cell Surface Involves C-terminal Cleavage by Glycosylphosphatidyl Inositol-anchored Membrane Type 4-Matrix Metalloproteinase and Binding of the Activated Proteinase to Chondroitin Sulfate and Heparan Sulfate o. *J Biol Chem* 279:10042–10051.
- Gao S, Geyter C De, Kossowska K, Zhang H. 2007. FSH stimulates the expression of the ADAMTS-16 protease in mature human ovarian follicles. *Mol Hum Reprod* 13:465–71.
- Garcia-Cruz¹ R, Brienño MA, Roig I, Grossmann M, Velilla E, Brien MA, Pujol A, Cabero L, Pessarrodona A, Barbero JL. 2010. Dynamics of cohesin proteins REC8 , STAG3 , SMC1 b and SMC3 are consistent with a role in sister chromatid cohesion during meiosis in human oocytes. 25:2316–2327.
- Gelse K, Po E, Aigner T. 2003. Collagens — structure , function , and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55:1531–1546.
- Goor H van, Melenhorst WB, Turner AJ, Holgate ST. 2010. Adamalysins in biology and disease. *J Pathol* 220:114–125.
- Goswami D, Conway GS. 2005. Premature ovarian failure. *Hum Reprod Update* 11:391–410.
- Guo F, Lai Y, Tian Q, Lin EA, Kong L, Liu C. 2010. Granulin-Epithelin Precursor Binds Directly to ADAMTS-7 and ADAMTS-12 and Inhibits Their Degradation of Cartilage Oligomeric Matrix Protein. *Arthritis Rheum* 62:2023–2036.
- Hagglund A-C, Basset P, Ny T. 2001. Stromelysin-3 Is Induced in Mouse Ovarian Follicles Undergoing Hormonally Controlled Apoptosis , but This Metalloproteinase Is Not Required for Follicular Atresia 1. *Biol Reprod* 463:457–463.
- Hagglund A-C, Leonardsson AN, Goran Ny T or. 1999. Regulation and Localization of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in the Mouse Ovary during. *Society* 140:.
- Hannenhalli S, Kaestner KH. 2009. The evolution of Fox genes and their role in development and disease. *Nat Rev Genet* 10:233–40.
- Harris SE, Chand AL, Winship IM, Gersak K, Aittomäki K, Shelling AN. 2002. Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* 8:729–33.
- Hashimoto O, Moore RK, Shimasaki S. 2005. Posttranslational processing of mouse and human BMP-15 : Potential implication in the determination of ovulation quota.
- Hashimotoa Yb G, Aokic T, Nakamura H, Tanzawad K, Yasunori Okadaa. 2001. Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, 2, 3 and 4). *FEBS Lett* 494:192–195.

- Hinsbergh VWM Van, Koolwijk P. 2008. Endothelial sprouting and angiogenesis : matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res* 78:203–212.
- Hirshfield AN. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124:43–101.
- Ho Y, Gargano M, Cao J, Bronson RT, Heimler I, Hutz RJ, Ho Y, Gargano M, Cao J, Bronson RT, Heimler I, Hutz RJ. 1998. NUCLEIC ACIDS , PROTEIN SYNTHESIS , AND MOLECULAR GENETICS : Reduced Fertility in Female Mice Lacking Reduced Fertility in Female Mice Lacking Copper-Zinc Superoxide Dismutase *. *Biol Chem* 273:7765–7769.
- Houmard B, Small C, Yang L, Nalwai-cecchini T, Cheng E, Hassold T, Griswold M. 2009. Global Gene Expression in the Human Fetal Testis and Ovary 1. *Biol Reprod* 443:438–443.
- Howell S, Shalet S. 1998. Gonadal Damage From Chemotherapy And Radiotherapy. *Gonadal Disord* 27:927–943.
- Huet C, Monget P, Pisselet C, Monniaux D. 1997. Changes in extracellular matrix components and steroidogenic enzymes during growth and atresia of antral ovarian follicles in the sheep. *Biol Reprod* 56:1025–34.
- Huntriss J, Gosden R, Hinkins M, Oliver B, Miller D, Rutherford AJ, Picton HM. 2002. Isolation , characterization and expression of the human Factor In the Germline alpha (FIGLA) gene in ovarian follicles and oocytes. *Mol Hum Reprod* 8:1087–1095.
- Hutt KJ, Albertini DF. 2007. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod Biomed Online* 14:758–764.
- Hynes RO. 2009. The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Relat Res Sci (New York, NY)* 326:2009.
- Iruela-arispe ML, Lombardo M, Kruttsch HC, Lawler J, Roberts DD. 1999. Inhibition of Angiogenesis by Thrombospondin-1 Is Mediated by 2 Independent Regions Within the Type 1 Repeats. *Circulation* 100:1423–1431.
- Irving-Rodgers HF, Friden BE, Morris SE, Mason HD, Brannstrom M, Sekiguchi K, Sanzen N, Sorokin LM, Sado Y, Ninomiya Y, Rodgers RJ. 2006. Extracellular matrix of the human cyclic corpus luteum. *Mol Hum Reprod* 12:525–534.
- Irving-Rodgers HF, Harland ML, Rodgers RJ. 2004. A novel basal lamina matrix of the stratified epithelium of the ovarian follicle. *Matrix Biol* 23:207–217.
- Iwahashi M, Muragaki Y, Ooshima A, Nakano R. 2000. Type VI collagen expression during growth of human ovarian follicles. *Fertil Steril* 74:343–347.
- Jacobi CLJ, Rudigier LJ, Scholz H, Kirschner KM. 2013. Developmental Biology : Transcriptional regulation by the Wilms tumor protein , Wt1 , suggests a role of the metalloproteinase Adamts16 in murine genitourinary development. *J Biol Chem* 288:0–27.

- Jiao X, Qin Y, Li G, Zhao S, You L, Ma J, Simpson JL, Chen Z-J. 2015. Novel NR5A1 missense mutation in premature ovarian failure: detection in han chinese indicates causation in different ethnic groups. *PLoS One* 8:e74759.
- Jin P, Warren ST. 2000. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 9:901–908.
- Jirawatnotai S, Moons DS, Stocco CO, Franks R, Hales DB, Gibori G, Kiyokawa H. 2003. The cyclin-dependent kinase inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 cooperate to restrict proliferative life span in differentiating ovarian cells. *J Biol Chem* 278:17021–7.
- Jones GC, Riley GP. 2005. Review ADAMTS proteinases: a multi-domain , multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther* 7:160–169.
- Joshi S, Davies H, Sims LP, Levy SE, Dean J. 2007. Ovarian gene expression in the absence of FIGLA, an oocyte-specific transcription factor. *BMC Dev Biol* 7:67.
- Jr CTA, Wilkinson KD, Reines D, Warren ST. 1993. FMR1 Protein: Conserved RNP Family Domains and Selective RNA Binding. *Science* (80-) 939:.
- Juenguel JL, Garverick HA, Johnson AL, Youngquist RS, Smith F. 1993. Apoptosis during Luteal Regression. *Endocrinology* 132:2–7.
- Kaboord B, Perr M. 2008. Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol Biol* 424:349–364.
- Kashiwagi M, Tortorella M, Nagase H, Brew K. 2001. TIMP-3 Is a Potent Inhibitor of Adam-ts aggrecanase. *J Biol Chem* 1:12501–12505.
- Kelwick R, Desanlis I, Wheeler GN, Edwards DR. 2015. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol* 16:113.
- Kevorkian L, Young DA, Darrah C, Donell ST, Shepstone L, Porter S, Brockbank SM V, Edwards DR, Parker AE, Clark IM. 2004. Expression Profiling of Metalloproteinases and Their Inhibitors in Cartilage. *Arthritis Rheum* 50:131–141.
- Khole V. 2010. Does ovarian autoimmunity play a role in the pathophysiology of premature ovarian insufficiency? *J Midlife Health* 1:9–13.
- Kim JY. 2012. Control of ovarian primordial follicle activation. *Clin Exp Reprod Med* 39:10–14.
- Knauff E a H, Franke L, Es M a van, Berg LH van den, Schouw YT van der, Laven JSE, Lambalk CB, Hoek A, Goverde AJ, Christin-Maitre S, Hsueh AJ, Wijmenga C, et al. 2009a. Genome-wide association study in premature ovarian failure patients suggests ADAMTS19 as a possible candidate gene. *Hum Reprod* 24:2372–2378.
- Knauff EAH, Franke L, Es MA Van, Berg LH Van Den, Schouw YT Van Der, Laven JSE, Lambalk CB, Hoek A, Goverde AJ, Christin-maitre S, Hsueh AJ, Wijmenga C, et al. 2009b. Genome-wide association study in premature ovarian failure patients suggests

- ADAMTS19 as a possible candidate gene. *Hum Reprod* 24:2372–2378.
- Kokcu A, Yavuz E, Celik H, Bildircin D. 2012. A panoramic view to relationships between reproductive failure and immunological factors. *Arch Gynecol Obstet* 286:1283–9.
- Kozak M. 2002. Emerging links between initiation of translation and human diseases. *Mamm Genome* 410:.
- Krege JH, HODGIN JB, COUSE JF, ENMARK E, WARNER M, MAHLER JF, SAR M, KORACH KS, GUSTAFSSON J-A, SMITHIES O. 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor α . *Med Sci* 95:15677–15682.
- Kuechler A, Kleinau G, Albrecht B, Hauffa BP, Ko A, Horsthemke B. 2010. An unbalanced translocation unmasks a recessive mutation in the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene and causes FSH resistance. *Eur J Hum Genet* 656–661.
- Kuno K, Matsushima K. 1998. ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *J Biol Chem* 273:13912–13917.
- Laissue P. 2015. Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Mol Cell Endocrinol* 411:243–257.
- Laissue P, Christin-maitre S, Touraine P, Kuttann F, Ritvos O, Aittomaki K, Bourcigaux N, Jacquesson L, Bouchard P, Frydman R, Dewailly D, Jeffery L, et al. 2006. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol* 154:22–24.
- Laissue P, Lakhal B, Benayoun BA, Dipietromaria A, Braham R, Elghezal H, Philibert P, Saâd A, Sultan C, Fellous M, Veitia RA. 2009. Functional evidence implicating FOXL2 in non-syndromic premature ovarian failure and in the regulation of the transcription factor OSR2. *J Med Genet* 46:455–7.
- Laissue P, Vinci G, Veitia RA, Fellous M. 2008. Recent advances in the study of genes involved in non-syndromic premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol* 282:101–111.
- Lalli E, Doghman M, Late PL De, Wakil A El, Mus-veteau I. 2013. Molecular and Cellular Endocrinology Beyond steroidogenesis: Novel target genes for SF-1 discovered by genomics. *Mol Cell Endocrinol* 371:154–159.
- Lampe A, Flanigan K, Bushby K, Hicks D. 2012. Genetics Home Reference. *J Med Libr Assoc* 92:282–283.
- Larsen M, Wei C, Yamada KM. 2006. Cell and fibronectin dynamics during branching morphogenesis. *J Cell Sci* 119:3376–84.
- Latronico AC, Anasti J, Arnhold IJ, Rapaport R, Mendonca BB, Bloise W, Castro M, Tsigos C, Chrousos GP. 1996. Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing

- hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *N Engl J Med* 334:507–12.
- Latronico AC, Chai Y, Arnhold IJP, Liu X, Mendonca BB, Segaloff DL. 1998. A Homozygous Microdeletion in Helix 7 of the Luteinizing Hormone Receptor Associated with Familial Testicular and Ovarian Resistance Is Due to Both Decreased Cell Surface Expression and Impaired Effector Activation by the Cell Surface Receptor. 442–450.
- Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya SS. 2003. Fox's in development and disease. *Trends Genet* 19:339–44.
- Li Q, Rajanahally S, Edson M a, Matzuk MM. 2009. Stable expression and characterization of N-terminal tagged recombinant human bone morphogenetic protein 15. *Mol Hum Reprod* 15:779–88.
- Li SW, Arita M, Fertala A, Bao Y, Kopen GC, Långsjö TK, Hyttinen MM, Helminen HJ, Prockop DJ. 2001. Transgenic mice with inactive alleles for procollagen N-proteinase (ADAMTS-2) develop fragile skin and male sterility. *Biochem J* 355:271–8.
- Liang L, Soyal SM, Dean J. 1997. FIGalpha, a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development* 124:4939–47.
- Lin L, Achermann JC. 2008. Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sex Dev* 2:200–9.
- Liu K, Olofsson JI, Wahlberg P, Ny T. 1999. Distinct expression of gelatinase A [matrix metalloproteinase (MMP)-2], collagenase-3 (MMP-13), membrane type MMP 1 (MMP-14), and tissue inhibitor of MMPs type 1 mediated by physiological signals during formation and regression of the rat corpus luteum. *Endocrinology* 140:5330–5338.
- Loesch DZ, Bui QM, Huggins RM, Mitchell RJ, Hagerman RJ. 2007. Transcript levels of the intermediate size or grey zone fragile X mental retardation 1 alleles are raised, and correlate with the number of CGG repeats. *J med Genet* 44:200–205.
- Lourenço D, Brauner R, Lin L, Perdigo A De, Weryha G, Muresan M, Boudjenah R, Guerra-Junior G, Maciel-Guerra AT, Achermann JC, McElreavey K, Bashamboo A. 2009. Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med* 360:1200–10.
- Lu B, Poirier C, Gaspar T, Gratzke C, Harrison W, Busija D, Matzuk MM, Andersson K, Overbeek PA, Bishop CE, Al LUET. 2008. A Mutation in the Inner Mitochondrial Membrane Peptidase 2-Like Gene (Imp2l) Affects Mitochondrial Function and Impairs Fertility in Mice 1. *Biol Reprod* 610:601–610.
- Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. 2011a. Extracellular Matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:.
- Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z, Lu P, Takai K, Weaver VM, Hynes RO, Naba A,

- Huttenlocher A, Horwitz AR, Geiger B, et al. 2011b. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:.
- Lubahn DB, Moyer JS, Thomas S, Couse JF. 1993. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Genetics* 90:11162–11166.
- Luo X, Ikeda Y, Parker KL. 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481–90.
- Maclaran K, Horner E, Panay N. 2010. Premature ovarian failure: long-term sequelae. *Menopause Int* 16:38–41.
- Maclaran K, Panay N. 2011. Premature ovarian failure. 35–42.
- Magoffin DA. 2005. Ovarian theca cell. *Biochem cell Biol* 37:1344–1349.
- Manzanque JCR, Milchanowski AB, Erick K, Dufour R, Iruela-Arispe L a, Luisa M. 2000. Post-Translation Modification And Degradation : Forms Characterization of METH-1 / ADAMTS1 Processing Reveals Two Distinct Active Forms. *J Biol Chem* 275:33471–33479.
- Maraldi NM, Sabatelli P, Columbaro M, Zamparelli A, Manzoli FA, Bernardi P, Bonaldo P, Merlini L. 2009. Advances in Enzyme Regulation Collagen VI myopathies : From the animal model to the clinical trial. *Adv Enzyme Regul* 49:197–211.
- Massagué J, Seoane J, Wotton D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev* 19:2783–2810.
- Matzuk MM. 1998. Printed in U.S.A. 4008. 139:4008–4011.
- McClelland KS, Wainwright EN, Bowles J, Koopman P. 2015. Rapid screening of gene function by systemic delivery of morpholino oligonucleotides to live mouse embryos. *PLoS One* 10:e0114932.
- Mcculloch DR, Nelson CM, Dixon LJ, Silver DL, Wylie JD, Lindner V, Sasaki T, Cooley MA, Argraves WS, Apte SS. 2009. Article ADAMTS Metalloproteases Generate Active Versican Fragments that Regulate Interdigital Web Regression. *Dev Cell* 17:687–698.
- Mehta GD, Kumar R, Srivastava S, Ghosh SK. 2013. Cohesin : Functions beyond sister chromatid cohesion. *FEBS Lett* 587:2299–2312.
- Menke DB, Koubova J, Page DC. 2003. Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Dev Biol* 262:303–312.
- Menke DB, Page DC. 2002. Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad. *Gene Expr Patterns* 2:359–367.
- Mittaz L, Russell DL, Wilson T, Brasted M, Tkalcovic J, Salamonsen LA, Hertzog PJ, Pritchard MA. 2004. Adamts-1 is essential for the development and function of the urogenital system. *Biol Reprod* 70:1096–105.

- Mochizuki S, Okada Y. 2007. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci* 98:621–628.
- Mott JD, Werb Z. 2004. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases.
- N. Camats A, Pandey M V., Fernandez-cancio P, Andaluz M, Janner N, Tora´ n F, Moreno A, Bereket T, Akcay E, García-garcía M, Oz TM, R. Gracia M, et al. 2012. Ten Novel Mutations in the NR5A1 Gene Cause Disordered Sex Development in 46 , XY and Ovarian Insufficiency in 46 , XX Individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 97:1294–1306.
- Nelson RM, Long GL. 1991. Solution-Phase Equilibrium Binding Interaction. *Biochemistry* 30:2384–2390.
- Nett TM, McClellan MC, Niswender GD. 1976. Effects of Prostaglandins Flow , Secretion on the Ovine of Progesterone Corpus Luteum : and Morphology ’ of intact. *Biol Reprod* 66–78.
- Nicholson AC, Malik S-B, Logsdon JM, Meir EG Van. 2005. Functional evolution of ADAMTS genes: evidence from analyses of phylogeny and gene organization. *BMC Evol Biol* 5:11.
- Nusgens B, Verellen-Dumoulin C, Hermanns-Lê T, Paepe A De, Nuytinck L, Piérard G, Lapière C. 1992. Evidence for a relationship between Ehlers-Danlos type VII C in humans and bovine dermatosparaxis. *Nat Genet* 1:214–217.
- Ny. T, Peng X-R, Ohlsson M. 1993. of Cell and Molecular Biology, University. *Thromb Res* 1:3848.
- Ny T, Wahlberg P, Brändström IJM. 2002. Matrix remodeling in the ovary: Regulation and functional role of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems. *Mol Cell Endocrinol* 187:29–38.
- Ojeda D, Lakhal B, Fonseca DJ, Braham R, Landolsi H, Mateus HE, Restrepo CM, Elghezal H, Saâd A, Laissue P. 2011. Sequence analysis of the CDKN1B gene in patients with premature ovarian failure reveals a novel mutation potentially related to the phenotype. *Fertil Steril* 95:2658–2661.
- Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. 2000. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 275:39523–8.
- Otte A, Roy D, Siemerink M, Koster C, Hochstenbach F, Timmermans A, J A. 1990. Characterization of a Maternal Type VI Collagen in. *J Cell Biol* 111:271–278.
- Overall CM, Lopez-Otin C. 2002. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2:657–672.
- Papers JBC, Doi M, Russell DL, Doyle KMH, Ochsner SA, Sandy JD, Richards JS. 2003. Processing and Localization of ADAMTS-1 and Proteolytic Cleavage of Versican during Cumulus Matrix Expansion and Ovulation *. *J Biol Chem* 278:42330–42339.

- Pasquale E Di, Beck-Peccoz P, Persani L. 2004. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet* 75:106–11.
- Patel DH, Wi SG, Bae HJ. 2009. Modification of overlap extension PCR : A mutagenic approach. 8:183–186.
- Peng J, Li Q, Wigglesworth K, Rangarajan A, Kattamuri C, Peterson RT, Eppig JJ, Thompson TB, Matzuk MM. 2013. Growth differentiation factor 9:bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E776-85.
- Persani L, Rossetti R, Cacciato C. 2010. Genes involved in human premature ovarian failure. *J Mol Endocrinol* 45:257–279.
- Persani L, Rossetti R, Cacciato C, Fabre S. 2011. Genetic defects of ovarian TGF- β -like factors and premature ovarian failure. *J Endocrinol Invest* 34:244–51.
- Philibert P, Paris F, Lakhal B, Audran F, Gaspari L, Saâd A, Christin-Maître S, Bouchard P, Sultan C. 2013. NR5A1 (SF-1) gene variants in a group of 26 young women with XX primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril* 99:484–9.
- Pieretti M, Zhang F, Fu Y, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL. 1991. Absence of Expression in Fragile X Syndrome of the HIM-7 Gene. *Cell* 66:817–822.
- Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. 2005. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* 386:15–27.
- Pratta MA, Yao W, Decicco C, Tortorella MD, Liu R, Copeland RA, Magolda R, Newton RC, Trzaskos JM, Arner EC. 2003. Aggrecan Protects Cartilage Collagen from Proteolytic Cleavage *. *Biol Chem* 278:45539–45545.
- Primakoff P, Myles DG. 2002. Penetration , Adhesion , and Fusion in Mammalian Sperm-Egg Interaction. *Science* (80-) 2183:2183–2184.
- Pyun J a., Kim S, Cha DH, Kwack K. 2013. Epistasis between IGF2R and ADAMTS19 polymorphisms associates with premature ovarian failure. *Hum Reprod* 28:3146–3154.
- Pyun J, Kim S, Kwack K. 2015. Epistasis between polymorphisms in ACVR2B and ADAMTS19 is associated with premature ovarian failure. *Menopause* 22:212–216.
- Qin Y, Choi Y, Zhao H, Simpson JL, Chen Z-J, Rajkovic A. 2007. NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 81:576–581.
- Qin Y, Jiao X, Simpson JL, Chen ZJ. 2015. Genetics of primary ovarian insufficiency: New developments and opportunities. *Hum Reprod Update* 21:787–808.
- Rajkovic A, Pangas S a, Matzuk MM. 2006. Follicular Development : Mouse , Sheep , and Human Models. p 318–423.
- Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM. 2004. NOBOX deficiency

- disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 305:1157–9.
- Rannikko A, Pakarinen P, Manna PR, Beau I, Misrahi M, Huhtaniemi I. 2002. Functional characterization of the human FSH receptor with an inactivating Ala189Val mutation. *Mol Hum Reprod* 8:311–317.
- Rao C, Foernzler D, Loftus SK, Liu S, McPherson JD, Jungers KA, Apte SS, Pavan WJ, Beier DR. 2003. A defect in a novel ADAMTS family member is the cause of the belted white-spotting mutation. *Development* 130:4665–72.
- Rawlings ND, Barrett AJ. 1995. [13] Evolutionary families of metallopeptidases. In: *Enzymology BT-M* in, editor. *Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases*, Academic Press, p 183–228.
- Reynaud K, Ph D, Cortvrindt R, Sc M, Verlinde F. 2004. Number of ovarian follicles in human fetuses with the 45 , X karyotype. 81:.
- Rhodes JM, Simons M. 2007. The extracellular matrix and blood vessel formation : not just a scaffold. *J Cell Mol Med* 11:176–205.
- Richards JS. 1994. Hormonal Control of Gene Expression in the Ovary. *Endocr Rev* 15:725–751.
- Richards JS, Liu Z, Shimada M. 2008. Immune-like mechanisms in ovulation. *Endocrinol Metab* 19:191–196.
- Robker RL, Russell DL, Espey LL, Lydon JP, Malley BWO, Richards JS. 2000. Progesterone-regulated genes in the ovulation process : ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:.
- Roby KF, Son D, Terranova PF. 1999. Alterations of Events Related to Ovarian Function in Tumor Necrosis Factor Receptor Type I Knockout Mice 1. *Biol Reprod* 1621:1616–1621.
- Rodgers RJ, Helen. F I-R, Russell DL. 2003a. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Semin Reprod Med* 24:195–203.
- Rodgers RJ, Ir HF. 2002. Extracellular matrix of the bo v ine o v arian membrana granulosa. 191:57–64.
- Rodgers RJ, Irving-rodders HF, Russell DL. 2003b. Review Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reprod Biol* 126:415–424.
- Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF, Wezel IL Van. 2000. Extracellular matrix in ovarian follicles. *Mol Cell Endocrinol* 163:73–79.
- Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM. 2010. Matrix metalloproteinases : What do they not do ? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta* 39–54.
- Rosewell KL, Al-alem L, Ph D, Zakerkish F, Mccord L. 2014. Induction of proteinases in

- the human preovulatory follicle of the menstrual cycle by human chorionic gonadotropin. 1–8.
- Rozario T, Desimone DW. 2010. The extracellular matrix in development and morphogenesis : A dynamic view. *Dev Biol* 341:126–140.
- Rubio-Gozalbo, Gubbels CS, Bakker JA, Menheere PPCA, Wodzig WKWH, Land JA. 2010. Gonadal function in male and female patients with classic galactosemia. *Hum Reprod Update* 16:177–188.
- Russell DL, Brown HM, Dunning KR. 2014. ADAMTS proteases in fertility. *Matrix Biol* 44–46:54–63.
- Sagane K, Yamazaki K, Mizui Y, Tanaka I. 1999. Cloning and chromosomal mapping of mouse ADAM11 . *Gene* 236:79–86.
- Santos MG, Machado AZ, Martins CN, Domenice S, Costa EMF, Nishi MY, Ferraz-de-souza B, Jorge SAC, Pereira CA, Soardi FC, Mello MP De, Maciel-guerra AT, et al. 2014. Homozygous Inactivating Mutation in NANOS3 in Two Sisters with Primary Ovarian Insufficiency. *Biomed Res Int* 2014:1–9.
- Sawyer HR, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ, McNatty KP. 2002. Formation of Ovarian Follicles During Fetal Development in Sheep 1. *Biol Reprod* 1150:1134–1150.
- Scacheri PC, Gillanders EM, Subramony SH, Vedanarayanan V, Crowe CA. 2002. Novel mutations in collagen VI genes Expansion of the Bethlem myopathy phenotype. *Neurology* 58:593–602.
- Scheifflinger F, Knöbl P, Trattner B, Plaimauer B, Mohr G, Dockal M, Dorner F, Rieger M. 2003. Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 102:3241–3.
- Shelling AN. 2010. Premature ovarian failure.
- Shiloh Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3:155–68.
- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. 2004. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 25:72–101.
- Shindo T, Kurihara H, Kuno K, Yokoyama H, Wada T, Kurihara Y, Imai T, Wang Y, Ogata M, Nishimatsu H, Moriyama N, Oh-hashii Y, et al. 2000a. ADAMTS-1 : a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth , fertility , and organ morphology and function. *J Clin Invest* 105:1345–1352.
- Shindo T, Kurihara H, Kuno K, Yokoyama H, Wada T, Kurihara Y, Imai T, Wang Y, Ogata M, Nishimatsu H, Moriyama N, Oh-hashii Y, et al. 2000b. ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J Clin Invest* 105:1345–52.

- Sillem M, Prifti S, Neher M, Runnebaum B. 1998. Extracellular matrix remodelling in the endometrium and its possible relevance to the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod Update* 4:730–735.
- Silvera LA, Barrios C. 2012. La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Salud Uninorte* 16:9–18.
- Smith MF, Ricke W a., Bakke LJ, Dow MPD, Smith GW. 2002. Ovarian tissue remodeling: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Mol Cell Endocrinol* 191:45–56.
- Soejima K, Matsumoto M, Kokame K, Yagi H, Ishizashi H, Maeda H, Nozaki C. 2003. ADAMTS-13 cysteine-rich / spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *HEMOSTASIS, Thromb Vasc Biol* 102:3232–3238.
- Somerville RPT, Longpre J-M, Jungers KA, Engle JM, Ross M, Evanko S, Wight TN, Leduc R, Apte SS. 2003. Characterization of ADAMTS-9 and ADAMTS-20 as a distinct ADAMTS subfamily related to *Caenorhabditis elegans* GON-1. *J Biol Chem* 278:9503–13.
- Soyal SM, Amleh A, Dean J. 2000. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 127:4645–54.
- Spicer LJ, Aad PY. 2007. Insulin-Like Growth Factor (IGF) 2 Stimulates Steroidogenesis and Mitosis of Bovine Granulosa Cells Through the IGF1 Receptor : Role of Follicle-Stimulating Hormone and IGF2 Receptor 1. *Biol Reprod* 27:18–27.
- Stamouli A, Sullivan O, Frankel S, Thomas EJ, Richardson MC. 1996. Suppression of matrix metalloproteinase production by hCG in cultures of human luteinized granulosa cells as a model for. *J Reprod Fertil* 105:235–239.
- Stavrou S s., Zhu Y, Cai L, Katz melissa d., Herrera C, Defillo-ricart M, Imperato-mcginley J. 1998. A Novel Mutation of the Human Luteinizing Hormone Receptor in 46XY and 46XX Sisters *. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2091–2098.
- Sterchi EE. 2009. Special issue: Metzincin metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29:255–257.
- Strickland S, Richards WG. 1992. Invasion of the trophoblasts. *Cell* 71:355–7.
- Strongin A., I C, G. B, BL. M, Grant G A, Goldberg. 1995. Mechanism of cell surface activa- tion of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol* 270:5331–5338.
- Su Y, Wigglesworth K, Pendola FL, Brien MJO, Eppig JJ, Harbor B. 2002. Mitogen-Activated Protein Kinase Activity in Cumulus Cells Is Essential for Gonadotropin-Induced Oocyte Meiotic Resumption and Cumulus Expansion in the Mouse. *Endocrinology* 143:2221–2232.
- Suwanai AS, Ishii T, Haruna H, Yamataka A, Narumi S. 2013. A report of two novel NR5A1 mutation families : possible clinical phenotype of psychiatric symptoms of anxiety and / or depression. *Clin Endocrinol (Oxf)* 78:957–965.

- Suzuki A, Saga Y. 2008. Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes Dev* 22:430–435.
- Suzuki H, Tsuda M, Kiso M, Saga Y. 2008. Nanos3 maintains the germ cell lineage in the mouse by suppressing both Bax-dependent and -independent apoptotic pathways. *Dev Biol* 318:133–142.
- Suzumori N, Yan C, Matzuk MM, Rajkovic A. 2002. Nobox is a homeobox-encoding gene preferentially expressed in primordial and growing oocytes. *Mech Dev* 111:137–41.
- Sybert VP, McCauley E. 2004. Turner's Syndrome. *N Engl J Med* 1227–1238.
- Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Mills JB, Harris SW, Gane LW, Hagerman PJ. 2000. Clinical Involvement and Protein Expression in Individuals With the FMR1 Premutation. 152:144–152.
- Tedesco TA, Miller KL. 1979. Galactosemia : Alterations in Sulfate Metabolism Secondary. *Science* 666:1395–7.
- Themmen APN, Huhtaniemi IT. 2000. Mutations of Gonadotropins and Gonadotropin Receptors : Elucidating the Physiology and Pathophysiology of Pituitary-Gonadal Function. *Endocr Rev* 21:551–583.
- Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. 2015. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* 97:4–27.
- Timpl R, Brown JC. 1996. Supramolecular assembly of basement membranes. *BioEssays news Rev Mol Cell Dev Biol* 18:123–32.
- Toledo SP, Brunner HG, Kraaij R, Post M, Dahia PL, Hayashida CY, Themmen APKH. 1996.
- Toniolo D. 2006. X-linked premature ovarian failure : a complex disease. *Genet Dis* 16:293–300.
- Tortorella M, Pratta M, Liu RQ, Abbaszade I, Ross H, Burn T, Arner E. 2000. The thrombospondin motif of Aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. *J Biol Chem* 275:25791–25797.
- Tortorella MD, Malfait A, Deccico C, Arner E. 2001. The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthr Cartil* 4:539–552.
- Tortorella MD, Malfait F, Barve RA, Shieh H-S, Malfait A-M. 2009. A review of the ADAMTS family, pharmaceutical targets of the future. *Curr Pharm Des* 15:2359–74.
- Touraine P, Beau I, Gougeon A, Meduri G, Desroches A, Pichard C, Detoef M, Paniel B, Prieur M, Zorn J, Milgrom E, Kuttenn F, et al. 1999. New Natural Inactivating Mutations of the Follicle-Stimulating Hormone Receptor : Correlations between Receptor Function and Phenotype. *Mol Endocrinol* 13:1844–1854.
- Toussey T, Jorissen E, Reiss K, Hartmann D. 2006. (Make) stick and cut loose -

- Disintegrin metalloproteases in development and disease. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev* 78:24–46.
- Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, Abe K, Haraguchi S, Kobayashi S. 2003. Conserved Role of nanos Proteins in Germ Cell Development. *Science* (80-) 301:1239–41.
- Tyfield L, Reichardt J, Fridovich-Keil J, Croke DT, Elsas LJ, Strobl W, Kozak L, Coskun T, Novelli G, Okano Y, Zekanowski C, Shin Y, et al. 1999. Classical galactosemia and mutations at the galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT) gene. *Hum Mutat* 13:417–30.
- Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G. 2004. Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet* 13:1171–81.
- Vakonakis I, Campbell ID. 2007. Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure. *Curr Opin Cell Biol* 19:578–583.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, et al. 2001. The Sequence of the Human Genome. *Hum Genome* 291:.
- Wagenseil JE, Mecham RP. 2007. New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev* 81:229–240.
- Wang P, Tortorella M, England K, Malfait A, Thomas G, Arner EC, Pei D. 2004. Proprotein Convertase Furin Interacts with and Cleaves Pro-ADAMTS4 (Aggrecanase-1) in the trans -Golgi Network *. *J Biol Chem* 279:15434–15440.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. 2004. Mouse zona pellucida genes and glycoproteins. *Cytogenet Genome Res* 234:228–234.
- Weber. Kt, Facc. Pier Anversa, Paul W. Armstrong M, Facc, Christian G. Brilla, Md, Plrd, John C. Burnett. Jr. M, John M. Cruickshank et al.,1992. Remodeling and reparation of the cardiovascular system. *J Am Coll Cardiol* 20:3–16.
- Weiss A, Attisano L. 2013. The TGFbeta Superfamily Signaling Pathway. *Wires Dev Biol* 2:47–63.
- Weiss J, Meeks JJ, Hurley L, Raverot G, Frassetto A, Jameson JL. 2003. Sox3 Is Required for Gonadal Function , but Not Sex Determination , in Males and Females. 23:8084–8091.
- White JM. 2003. ADAMs: modulators of cell – cell and cell – matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol* 15:598–606.
- Woad KJ, Watkins WJ, Prendergast D, Shelling AN. 2006. The genetic basis of premature ovarian failure. *Aust New Zeal Obstet Gynaecol* 46:242–244.
- Wolfram B, Franz-Xaver G-R, Stickler W. 1993. Astacins , serralyins , snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (

- HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family , the. FEBS Lett 331:134–140.
- Wu X, Wang B, Dong Z, Zhou S, Liu Z, Shi G, Cao Y, Xu Y. 2013. A NANOS3 mutation linked to protein degradation causes premature ovarian insufficiency. *Cell Death Dis* 4:e825.
- Yan C, Wang P, Demayo J, Demayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad S V, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM. 2001. Synergistic Roles of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 in Ovarian Function. *Mol Endocrinol* 9:854–866.
- Yu H, Mouw JK, Weaver VM. 2010. Forcing form and function : biomechanical regulation of tumor evolution. *Trends Cell Biol* 21:47–56.
- Yu W, Yu SC, Meng Q, Brew K, Woessner JF. 2000. TIMP-3 Binds to Sulfated Glycosaminoglycans of the Extracellular Matrix * portant for the cellular regulation of activity of the ma-. *J Biol Chem* 275:31226–31232.
- Yurchenco P, Schittny J. 1990. Molecular architecture of basement membranes . *FASEB J* 4:1577–1590.
- Zhang X, Fei K, Agbas A, Yan L, Zhang J, O'Reilly B, Deutzmann R, Sarras MP. 2002. Structure and function of an early divergent form of laminin in hydra: A structurally conserved ECM component that is essential for epithelial morphogenesis. *Dev Genes Evol* 212:159–172.
- Zhao H, Chen Z-J, Qin Y, Shi Y, Wang S, Choi Y, Simpson JL, Rajkovic A. 2008. Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 82:1342–8.
- Zhao Y, Luck MR. 1995. Gene expression and protein distribution of collagen, fibronectin and laminin in bovine follicles and corpora lutea. *J Reprod Fertil* 104:115–123.
- Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K. 2001. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 276:41059–63.
- Zinn R, Ross JL, Epstein C. 1998. Turner syndrome and haploinsufficiency. *Curr Opin Genet Dev* 8:322–327.
- Zlotogora J, Sagi M, Cohen T. 1983. The blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome: delineation of two types. *Am J Hum Genet* 35:1020–7.